

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Kinderheilkunde II

**Nachweis pathogener Keime in Lebergewebe und Galle bei Patienten  
während Lebertransplantation**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Judith Maria Dörner  
aus Köln  
2012

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. P. Gerner

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. A. E. Canbay

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2013

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	6
1.1	Geschichte der Lebertransplantation .....	6
1.2	Gegenwärtige Situation der Lebertransplantation in Deutschland .....	6
1.2.1	Indikationen .....	7
1.2.2	Morbidität nach Lebertransplantation .....	8
1.2.3	Letalität nach Lebertransplantation .....	10
1.3	Infektionen bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung .....	11
1.4	Cholangitiden .....	12
1.5	Infektiöse Hepatitiden .....	13
1.6	Aktuelle Studienlage .....	14
1.6.1	Erregernachweis durch PCR-Analyse in während Transplantation entnommenen Leberbiopsien .....	14
1.6.2	Erregernachweis durch Kulturen in während Transplantation entnommenen Galleaspirationen und Gallengangsbiopsien .....	14
1.6.3	Erregernachweis durch Kulturen in Galle nach Lebertransplantation .....	15
2	Fragestellung und Zielsetzung .....	17
3	Material und Methoden .....	19
3.1	Patienten .....	19
3.2	Probengewinnung .....	20
3.3	Probentransport und -aufbewahrung .....	21
3.4	Kultureller Nachweis von Bakterien und Pilzen .....	21
3.4.1	Schritt 1 – Beimpfung der Nährmedien .....	21
3.4.2	Schritt 2a - Vorgehen bei klarem Nährmedium .....	22
3.4.3	Schritt 2b – Vorgehen bei trübem Nährmedium .....	22

3.4.4	Schritt 3 – Identifikation der Erreger und Erstellung des Antibiotogramms	23
3.5	Real Time PCR	24
3.5.1	Schritt 1 - DNA Extraktion durch MolYsis <sup>TM</sup>	25
3.5.2	Schritt 2 - Nachweis pathogener DNA mittels Real Time PCR	26
3.5.3	Schritt 3 - DNA Sequenzierung	28
3.5.4	Schritt 4 - DNA Sequenz Auswertung	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Patientenkollektiv	30
4.1.1	Alter und Geschlecht bei Transplantation	30
4.1.2	Indikationen zur Lebertransplantation	31
4.1.3	Cholestatische versus nicht cholestatische Lebererkrankungen	32
4.2	Ausgangsbedingungen vor Transplantation	33
4.2.1	Lebendspende und Verstorbenenspende	33
4.2.2	Fieber vor Transplantation	33
4.2.3	Laborparameter vor Transplantation	33
4.2.4	Präoperative Antibiotikagabe	34
4.2.5	Perioperative Antibiotikagabe	35
4.2.6	Präoperative Antimykotikagabe	36
4.2.7	Perioperative Antimykotikagabe	36
4.3	Erregernachweis	36
4.3.1	Kulturen der Leberbiopsien	36
4.3.2	Kulturen der Galleaspirationen	37
4.3.3	Real Time PCR	38
4.4	Methodenvergleich und Antibiotika- bzw. Antimykotikaresistenzen	40
4.5	Blutdiagnostik (Kultur/PCR-Analyse) innerhalb von sieben Tagen vor/nach Lebertransplantation	42

4.6	Histologische Zeichen für Cholangitis.....	44
4.7	Dreimonatsletalität.....	44
5	Diskussion .....	46
5.1	Interpretation der Ergebnisse .....	46
5.1.1	Erregernachweis mithilfe von Kulturen versus PCR-Analysen .....	47
5.1.2	Infektionserreger versus Kontaminationskeime .....	48
5.2	Vergleich mit anderen Studienergebnissen.....	50
5.3	Risikofaktoren für den Nachweis von Bakterien und Pilzen in Lebergewebe und Galle.....	52
5.3.1	Cholestatische versus nicht cholestatische Lebererkrankungen.....	53
5.3.2	Fieber .....	53
5.3.3	Positive Histologie.....	53
5.4	Kritische Sicht auf die Studie .....	54
5.5	Schlussfolgerungen .....	54
6	Zusammenfassung .....	56
7	Literaturverzeichnis.....	57
8	Anhang .....	64
8.1	Antibiotikaresistenzen .....	64
8.2	Antimykotikaresistenzen .....	79
8.3	Danksagung .....	80
8.4	Lebenslauf.....	81

## **1 Einleitung**

### **1.1 Geschichte der Lebertransplantation**

Die erste orthotope Lebertransplantation am Menschen wurde 1963 in Denver, USA von T. E. Starzl durchgeführt (Starzl et al., 1963). Der transplantierte Patient, ein dreijähriges Kind mit Gallengangatresie, verstarb intraoperativ an einer Hämorrhagie. In dem zitierten Artikel wurden zwei weitere von Starzl et al. (1963) durchgeführte Transplantationen aus dem gleichen Jahr beschrieben, bei denen die Patienten nach 22 bzw. 7 Tagen an einer Lungenembolie verstarben. Vier Jahre später überlebte ein Patient seine Lebertransplantation erstmals über ein Jahr, bevor er an den Metastasen seiner Grunderkrankung verstarb. Die 1-Jahresüberlebensrate, der bis 1976 in Denver operierten Patienten (insgesamt 111 Patienten), lag bei 28 % (Starzl et al., 1981a). Die Möglichkeiten der Immunsuppression waren bis Ende der Siebziger Jahre auf Kombinationen von Azathioprin, Kortikosteroiden und Antilymphozytenglobulin sowie auf die Drainage des Ductus thoracicus beschränkt. Seit Anfang der Achtziger Jahre wurde das 1976 entdeckte Ciclosporin A als Immunsuppressivum bei Transplantationen eingesetzt, was zu wesentlich höheren Überlebensraten führte (Starzl et al., 1981b). Auch die Weiterentwicklungen im Bereich der chirurgischen Technik, des perioperativen Managements und der Organkonservierung durch die „University of Wisconsin Lösung“ führten zu einer wesentlichen Verbesserung der Überlebenssituation der Patienten (Schmidt et al., 2008).

Im Jahr 1983 gaben die National Institutes of Health folgende Empfehlung: „Die Lebertransplantation ist eine aussichtsreiche Alternative zur konventionellen Therapie schwerer Lebererkrankungen in der Endphase“ (National Institutes of Health, 1984). In den folgenden Jahren und Jahrzehnten erfuhr die Lebertransplantation einen großen Durchbruch mit ständig steigenden Transplantationszahlen, die allerdings momentan aufgrund des nicht ausreichenden Organangebotes stagnieren (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2012).

### **1.2 Gegenwärtige Situation der Lebertransplantation in Deutschland**

Im Jahr 2011 wurden in Deutschland 1116 Lebertransplantationen nach postmortaler Organspende durchgeführt. Davon wurde in 28 Fällen eine kombinierte Transplantation

mit anderen Organen (Niere, Pankreas, Herz, Lunge) realisiert und in 72 Fällen eine Split-Lebertransplantation (Eurotransplant, 2012). Des Weiteren wurden 12 Lebern nach Dominospende und 71 Lebern nach Lebendspende transplantiert (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2012).

Allein am Universitätsklinikum Essen wurden im gleichen Jahr 131 Lebertransplantationen mit Organen postmortaler Spender und 10 Lebertransplantationen mit Organen lebender Spender durchgeführt (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2012).

Es besteht eine große Kluft zwischen der Anzahl der Patienten, die auf eine Transplantation warten und der Anzahl der verfügbaren Organe. Im Jahr 2011 wurden in Deutschland 1792 Patienten neu auf der Warteliste für Lebertransplantationen angemeldet. Dazu gehören nur die Erstanmeldungen, die Wiederholungsanmeldungen fanden keine Berücksichtigung (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2012).

### **1.2.1 Indikationen**

Die Lebertransplantation ist als kurative Therapieoption bei vielen fortgeschrittenen Lebererkrankungen bei Ausschöpfung der konservativen Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen. Laut den Richtlinien für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation der Bundesärztekammer kann eine Lebertransplantation medizinisch indiziert sein, wenn „Erkrankungen nicht rückbildungsfähig fortschreiten oder durch einen genetischen Defekt bedingt sind und das Leben gefährden oder die Lebensqualität hochgradig einschränken und durch die Transplantation erfolgreich behandelt werden können“ (Bundesärztekammer, 2011).

Zu den häufigsten Indikationen einer Lebertransplantation gehören Leberzirrhose, vor allem aufgrund von Virusinfektionen der Leber und Alkoholabusus, primäre Lebertumoren, genetische und metabolische Erkrankungen, cholestatische Lebererkrankungen und akutes Leberversagen (Bundesärztekammer, 2011, Adam et al., 2003).

Bei der alkoholinduzierten Leberzirrhose besteht die Einschränkung, dass die Patienten seit sechs Monaten abstinent sein müssen. Bei bösartigen Erkrankungen darf kein extrahepatisches Wachstum vorhanden sein (Bundesärztekammer, 2011). Weitere Kontraindikationen einer Lebertransplantation sind klinisch manifeste, extrahepatische

Infektionen, fortgeschrittene kardiopulmonale Erkrankungen und eine manifeste AIDS-Erkrankung (Bechstein, Burra, 2005).

Laut einer Veröffentlichung der Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) (Abbildung 1), war im Jahr 2011 die alkoholische Leberkrankheit und die damit einhergehende Leberzirrhose die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation in Deutschland.

2011 DEUTSCHLAND		
Indikationen für eine Lebertransplantation		
DIE HÄUFIGSTEN ICD-10 HAUPTDIAGNOSEN (BEI NEUANMELDUNG)		
K70	<b>Alkoholische Leberkrankheit</b>	502
K74	<b>Fibrose und Zirrhose der Leber</b>	422
C22	<b>Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge</b>	353
K72	<b>Leberversagen, anderenorts nicht klassifiziert</b>	153
Q44	<b>Angeborene Fehlbildungen der Gallenblase, der Gallengänge u. der Leber</b>	113
K83	<b>Sonstige Krankheiten der Gallenwege</b>	104
E98	<b>Sonstige Stoffwechselstörungen</b>	32
K76	<b>Sonstige Krankheiten der Leber</b>	32
E83	<b>Störungen des Mineralstoffwechsels</b>	27
I82	<b>Sonstige venöse Embolie und Thrombose</b>	14
		<b>1.752</b>
Bei einem Patienten sind mehrere Diagnosen möglich. Insgesamt: 18 Hauptdiagnosen bei 1.792 Fällen		
Quelle: Eurotransplant		DSO 98

**Abbildung 1: Indikationen für eine Lebertransplantation im Jahr 2011 in Deutschland**  
(Quelle: <http://www.dso.de/medien-und-presse/pressebilder-und-grafiken.html>)

Im Gegensatz zur häufigsten Indikation in Deutschland, ist weltweit die Hepatitis C Zirrhose die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation (Bechstein, Burra, 2005). Bei Kindern hingegen führt die Gallengangatresie zu 60 % aller primären Lebertransplantationen (Ganschow, 2011).

### 1.2.2 Morbidität nach Lebertransplantation

Lebertransplantationen können mit verschiedenen Komplikationen einhergehen. Man unterscheidet zwischen Früh- und Spätkomplikationen. Zu ersteren werden in absteigender Häufigkeit Infektionen (40 bis 80 %), akute Abstoßungen (10 bis 40 %), Gallengangskomplikationen (10 bis 40 %), primäre Nicht- bzw. Dysfunktion des Transplantates (5 bis 30 %) und Gefäßkomplikationen (2 bis 20 %) gezählt. Bei den Infektionen spielen bakterielle Infektionen mit 40 bis 60 % die



größte Rolle, gefolgt von viralen Infektionen mit 20 bis 40 % und Pilzinfektionen mit 10 bis 20 %, sowie den selten auftretenden Protozoeninfektionen mit kleiner 5 %. Zu den Spätkomplikationen gehören Rezidive der Grunderkrankung (30 bis über 90 %), Immunsuppressions-assoziierte Spätkomplikationen, Narbenhernien (15 %), späte Abstoßungen (2 bis 15 %) und Infektionen (2 bis 5 %). Vor allem bei Tumoren, Hepatitis B und C, sowie alkoholinduzierter Leberzirrhose kommt es vermehrt zu Rezidiven der Grunderkrankung. Zu den Immunsuppressions-assoziierten Komplikationen gehören Adipositas (50 bis 70 %), Osteoporose (30 bis 80 %), Hypertension (25 bis 70 %), Hyperlipidämie (30 bis 50 %), Hyperurikämie (10 bis 30 %) und Diabetes mellitus (4 bis 40 %) (Bechstein, Burra, 2005, Sheiner et al., 2000, Moon et al., 2006, Richards et al., 2005, Laish et al., 2011). Außerdem kann es durch die Immunsuppression zum Auftreten von Malignomen und akuter bzw. chronischer Niereninsuffizienz kommen (Sheiner et al., 2000, Ojo et al., 2003, Watt et al., 2009). Infektionen werden von zahlreichen Autoren als die häufigste Ursache für Morbidität nach Lebertransplantationen beschrieben (Bechstein, Burra, 2005, del Pozo, 2008, Fonseca-Aten, Michaels, 2006).

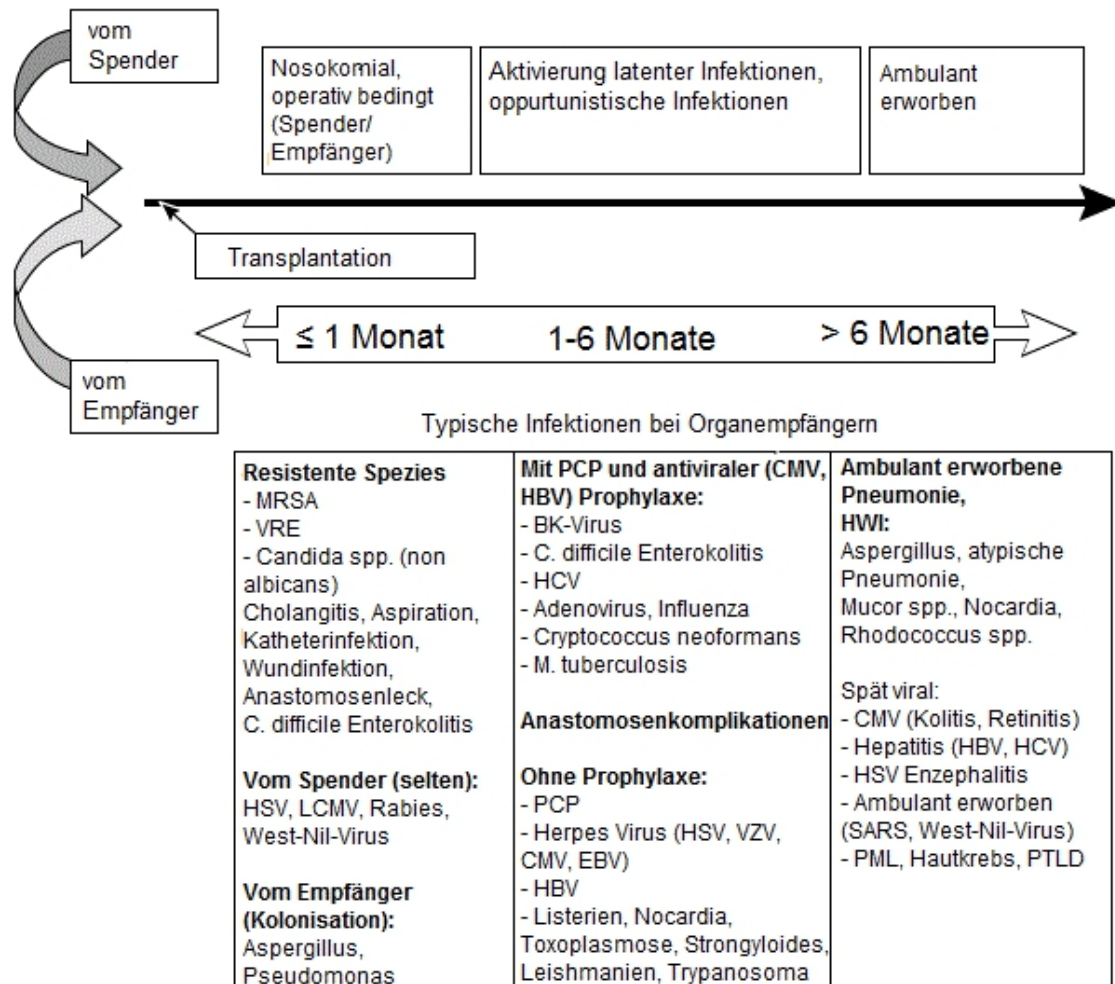
Postoperativ auftretende Infektionen können zeitlich gegliedert werden. So treten die meisten bakteriellen Infektionen im ersten Monat nach der Transplantation auf. Während dieser Zeitspanne spielen vor allem nosokomiale Infektionen als Komplikation der Operation und/oder des Krankenhausaufenthaltes und Reaktivierungen latenter Infektionen eine Rolle. Letztere können entweder vom Empfänger selbst stammen oder sind mit dem Spenderorgan übertragen worden. Um negative Folgen für den frisch transplantierten Patienten zu verhindern, ist eine von Antibiotikaresistenzbestimmungen geleitete, schnell einsetzende Therapie essentiell. Diese verlangt die mikrobiologische Analyse von Aspiraten oder Lebergewebe, um die Infektionen gezielt behandeln zu können (Fishman, AST Infectious Diseases Community of Practice, 2009, Fishman, 2007, Avery, 2002, Fishman et al., 2012a, Clark et al., 2011).

Während des zweiten bis sechsten postoperativen Monats entwickeln Patienten aufgrund der Immunsuppression häufig opportunistische Infektionen. Dabei spielen vor allem die verschiedenen Herpes Viren eine große Rolle.

Opportunistische Infektionen werden nach einem halben Jahr aufgrund der

üblicherweise niedriger dosierten Immunsuppression seltener. Zu diesem Zeitpunkt spielen ambulant erworbene Pneumonien eine Rolle (del Pozo, 2008, Fishman, AST Infectious Diseases Community of Practice, 2009).

Ein Überblick zu Infektionen nach Lebertransplantationen ist in Abbildung 2 gezeigt.



**Abbildung 2: Infektionen nach Transplantationen;** VRE: Vancomycin-resistente Enterokokken, LCMV: Lympozytäres Choriomeningitis-Virus, PCP: Pneumocystis jirovecii Pneumonie, BK-Virus: Humanes Polyomavirus 1, PML: progressive multifokale Leukenzephalopathie, PTLT: Post-Transplant lymphoproliferative disorder; (Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Fishman, AST Infectious Diseases Community of Practice, 2009)

### 1.2.3 Letalität nach Lebertransplantation

Adam et al. (2003) veröffentlichten ein Review mit Daten aus dem European Liver Transplant Registry (ELTR), einem Register, das Informationen zu mehr als 95 % aller seit 1968 in Europa durchgeführten Lebertransplantationen enthält. Dazu wurden Daten zu 39196 Lebertransplantationen von 1988 bis 2001 analysiert. Die Autoren konnten zeigen, dass mehr als zwei Drittel aller Todesfälle innerhalb des ersten Jahres nach

Lebertransplantation auftraten. Die Ein-Jahresüberlebensrate verbesserte sich im Laufe der letzten Jahrzehnte von knapp 34 % vor 1985, über 76 % in 1990, bis hin zu 83 % im Jahr 2001 (Adam et al., 2003).

In Deutschland lag die Fünf-Jahresüberlebensrate für die Jahre 2001 bis 2010 bei 52 % bei einer Verstorbenenspende und bei 55 % bei einer Lebendspende (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2012). Für das Kindesalter liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei rund 85 % (Martin et al., 2011, Miloh et al., 2011, Ng et al., 2008).

Die Hauptgründe für Letalität waren multiples Organversagen, zerebrovaskuläre, kardiovaskuläre, pulmonale und renale Komplikationen (zusammen 30 %), Sepsis (20 %), erneutes Auftreten der Grunderkrankung (meistens maligne Erkrankungen, 17 %), technische Komplikationen (meist hämorrhagischer und vaskulärer Art, 6 %) und Abstoßung der transplantierten Leber (4 %). Intraoperativ verstarben 5 % der Patienten und in 3 % aller Fälle kam es zu primärem Ausfall des transplantierten Organs (Adam et al., 2003).

Zahlreiche Autoren beschrieben Infektionen als die häufigste Ursache für Letalität nach Lebertransplantationen (Bechstein, Burra, 2005, Clark et al., 2011, Cuervas-Mons et al., 1986, Arnow, 1991, Kusne et al., 1988, Rayes et al., 1995, Torbenson et al., 1998). Die meisten lebensbedrohlichen Infektionen traten innerhalb von zwei Monaten nach der Transplantation auf (Bechstein, Burra, 2005, Clark et al., 2011). Vor allem Pilzinfektionen gehen trotz neuer diagnostischer Techniken und Antimykotika mit einer hohen Letalität einher (Singh, 2003).

### **1.3 Infektionen bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung**

Fortgeschrittene Lebererkrankungen sind mit Defekten des Immunsystems assoziiert, welche das Risiko für Infektionen sowie deren Schweregrad erhöhen. Das humorale und das zellgebundene Immunsystem sind davon gleichermaßen betroffen. Patienten mit Lebererkrankungen im Endstadium leiden typischerweise unter einer Fehlfunktion bakterizider und opsonierender Aktivitäten, beeinträchtigter Monozyten- und Phagozytenfunktion, gestörter Chemotaxis und geringer Komplementkonzentration im Serum. Ambulante und nosokomiale Infektionen spielen dabei eine wesentliche Rolle. Letztere werden unter anderem durch invasive diagnostische und therapeutische

Prozeduren hervorgerufen.

Zu den häufigsten bakteriellen Infektionen bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung gehören spontane bakterielle Peritonitiden, Harnwegsinfekte, ambulant erworbene Pneumonien, Hautinfektionen und Bakteriämien (Cheruvattath, Balan, 2007, Fernandez et al., 2002, Thalheimer et al., 2005).

Außerdem können fortgeschrittene Lebererkrankungen zu Cholangitiden führen (Cheruvattath, Balan, 2007).

Candida, Kryptokokken und Aspergillus sind einige Pilze, die Infektionen bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung auslösen können (Cheruvattath, Balan, 2007). Begünstigt durch Lebererkrankungen im Endstadium, lange Krankenhausaufenthalte sowie wiederholte Gabe von Breitspektrumantibiotika und -antimykotika kann es zur Kolonisation mit verschiedenen Erregern und Bildung von Resistenzen kommen. Zu den potentiellen Kolonisationskeimen gehören *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, Methicillin-resistente Staphylokokken und Vancomycin-resistente Enterokokken (Fishman et al., 2012a).

#### **1.4 Cholangitiden**

Unter einer Cholangitis versteht man eine Entzündung der Gallenwege. Man unterscheidet die akute Cholangitis von zwei chronischen Erkrankungen, der primär biliären Zirrhose und der primär sklerosierenden Cholangitis. Die akute Cholangitis wird bakteriell verursacht, wohingegen die beiden letztgenannten Erkrankungen als teils immunologisch bedingt angesehen werden, wobei die genaue Pathogenese noch nicht geklärt ist (Langner, Denk, 2001, Herold, 2011). Die akute Cholangitis entsteht meistens durch aus dem Duodenum aufsteigende Erreger. Sie kann sich aber auch hämatogen durch aus der Vena portae stammende Erreger entwickeln (Afdhal et al., 2011, Sung et al., 1992, Hahn, 2009).

Für die Pathogenese der akuten Cholangitis spielen vor allem biliäre Obstruktion und Stase eine große Rolle (Afdhal et al., 2011, Sung et al., 1992). So kann es zum Beispiel auch bei der primär sklerosierenden Cholangitis als Folge der Obstruktion der großen Gallengänge zu einer ascendierenden Cholangitis kommen (Langner, Denk, 2001). Chronische biliäre Obstruktion erhöht den Druck in den Gallenwegen. Dies wirkt sich

nachteilig auf Abwehrmechanismen wie hepatische Tight Junctions, Kupferzellen und die Produktion von Immunglobulin A aus, was die Migration von Bakterien aus der Vena portae ermöglicht. Wann immer die Barrierefunktion des Sphinkter Oddi durch Eingriffe gestört ist, erhöht sich ebenfalls das Risiko einer bakteriellen Besiedlung der Gallenwege (Afdhal et al., 2011, Sung et al., 1992).

Physiologischerweise sind die Gallenwege steril (Afdhal et al., 2011, Sung et al., 1992). Als bakterielle Auslöser für eine Cholangitis kommen typischerweise folgende Erreger in Frage: *Escherichia coli* (25 bis 50 %), *Enterococcus faecalis* (10 bis 20 %), *Klebsiella* spp. (15 bis 20 %), *Enterobacter* spp. (5 bis 10 %) und *Clostridium perfringens* (meist im Rahmen einer Mischinfektion) (Herold, 2011, Afdhal et al., 2011, Hahn, 2009, Brett, Heintschel von Heinegg, 1998). Es kann auch zu Infektionen mit Pilzen wie *Candida albicans* kommen (Hahn, 2009, Rudolph et al., 2009, Saito et al., 2003).

### **1.5 Infektiöse Hepatitiden**

Außer in den Gallenwegen kann sich eine Infektion auch direkt in Lebergewebe befinden. Bei einer Hepatitis kommt es zu einer entzündungsbedingten Schädigung und Funktionsstörung der Hepatozyten mit rundzelliger, vorwiegend lymphozytärer entzündlicher Infiltration (Schirmacher et al., 2004).

Es gibt vielfältige Auslöser für eine solche infektiöse Hepatitis. Viren haben hierbei mit Abstand die größte Bedeutung. Dabei sind vor allem die Familie der Hepatitisviren, sowie die verschiedenen Herpesviren, das Adenovirus, die Enteroviren und das Parvovirus B19 zu nennen. Daneben gibt es eine Vielzahl von Viruserkrankungen, die eine Begleithepatitis auslösen können, in Deutschland aber kaum eine Rolle spielen, wie zum Beispiel Dengue und Gelbfieber. Auch im Rahmen systemischer Infektionen mit verschiedenen bakteriellen Krankheitserregern kann es zu einer Begleithepatitis kommen. Meistens stehen dabei allerdings andere klinische Symptome im Vordergrund. Im Wesentlichen sind es folgende Bakterien, die eine Hepatitis verursachen können: *Bartonella* spp., *Borrellia* spp., *Brucella* spp., *Chlamydia* spp., *Clostridium* spp., *Coxiella* spp., *Escherichia coli*, *Francisella* spp., *Gonococcus* spp., *Legionella* spp., *Leptospira* spp., *Listeria* spp., *Mycobakterium* spp., *Salmonella* spp.,

Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Treponema spp. und Yersinia spp.

Pilzinfektionen der Leber können durch Candida spp., Cryptococcus spp. und Histoplasma spp. ausgelöst werden.

Außerdem gibt es Hepatitiden aufgrund von Parasiten, wie Malaria und Toxoplasmose (Denk, 2000, Schaefer, 2006).

## **1.6 Aktuelle Studienlage**

### **1.6.1 Erregernachweis durch PCR-Analyse in während Transplantation entnommenen Leberbiopsien**

Tanaka et al. (1999) untersuchten Leberbiopsien von 29 Patienten mit primär biliärer Zirrhose sowie 8 Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis, 10 Patienten mit chronischer Virushepatitis und 1 Patient mit alkoholischer Lebererkrankung. Die Probenentnahme fand während der Lebertransplantationen kurz nach Entnahme des kranken Organes statt. Außerdem wurden 7 Leberbiopsien von gesunden, potentiellen Lebendspendern untersucht. Alle Proben wurden mittels PCR-Analyse untersucht. Die Autoren wollten damit die Frage klären, ob bakterielle Infektionen, besonders durch atypische Mykobakterien, eine Rolle bei der Pathogenese der primär biliären Zirrhose spielen. Es wurde eine Vielzahl von Bakterien in den Leberbiopsien nachgewiesen, allerdings keines, das nur bei primär sklerosierender Cholangitis auftrat. Zu den nachgewiesenen Bakterien in mehreren Fällen gehörten im Wesentlichen Pseudomonas spp., Xanthomonas spp., Janthinobacterium lividum und Leptothrix sp. Auch Helicobacter pylori, Stenotrophomonas sp. und Acinetobacter junii wurden in jeweils einer Probe nachgewiesen (Tanaka et al., 1999).

### **1.6.2 Erregernachweis durch Kulturen in während Transplantation entnommenen Galleaspirationen und Gallengangsbiospien**

Olsson et al. (1998) untersuchten Gallengangsbiospien und Galle von 36 Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis und von 14 Patienten mit primär biliärer Zirrhose anhand von Kulturen. Die Probenentnahme fand während der Lebertransplantation, direkt nach der Explantation des erkrankten Organs, statt. Positive Kulturen wurden bei 21 Patienten mit primär sklerosierenden Cholangitis erhalten und bei keinem Patienten

mit primär biliärer Zirrhose. Bei 16 von 21 kulturpositiven Patienten wurden alpha-hämolysierende Streptokokken nachgewiesen und bei jeweils 5 kulturpositiven Patienten wurden *Enterococcus* spp. und *Staphylococcus* spp. nachgewiesen. Des Weiteren wurden *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pneumococcus* spp., *Pseudomonas* spp. und Pilze nachgewiesen (Olsson et al., 1998).

### **1.6.3 Erregernachweis durch Kulturen in Galle nach Lebertransplantation**

Millonig et al. (2006) haben berichtet, dass 73 % aller Gallenproben von Patienten von 1 Monat bis knapp 6 Jahre nach ihrer Lebertransplantation positiv auf Bakterien und/oder Pilze getestet wurden. Dabei handelte es sich um Patienten, bei denen eine biliäre Obstruktion mittels endoskopischer retrograder Cholangiographie (ERC) ausgeschlossen oder behandelt werden sollte, die man aufgrund steigender alkalischer Phosphatase oder Zeichen für Obstruktion im Ultraschall vermutete. Insgesamt waren 66 Patienten in die Studie eingeschlossen worden. 40 % der Kulturen waren positiv für einen Erreger und 60 % der Kulturen waren positiv für mehrere Erreger. In 48 % der Kulturen wurden grampositive Erreger nachgewiesen. Den größten Anteil hatten hierbei *Enterococcus* sp. (26 %) gefolgt von *Enterococcus faecium* (12 %). Weitere relevante Keime waren außerdem *Streptococcus intermedius* (3 %) und Koagulase-negative Staphylokokken (3 %). Unter den gramnegativen aeroben Erregern, die 39 % aller positiven Kulturen ausmachten, entfiel der Hauptteil auf *Klebsiella* sp. (11 %). Als weitere wichtige Erreger waren vor allem *Escherichia coli* (10 %) und *Enterobacter* sp. (4 %) sowie *Pseudomonas aeruginosa* (3 %) zu nennen. In 3 % aller positiven Kulturen wurden Anaerobier nachgewiesen, wobei es sich um *Bacteroides* sp. handelte. In 9 % aller positiven Kulturen wurde *Candida albicans* nachgewiesen (Millonig et al., 2006).

Kawecki et al. (2007) sammelten prospektiv Daten zu Galleaspiraten von 79 lebertransplantierten Patienten im ersten Monat nach der Operation, bei denen klinisch eine Cholangitis vermutet wurde. Aus 210 Galleaspiraten wuchsen 110 positive Kulturen von 59 Patienten (75 %) mit insgesamt 156 verschiedenen Bakterienstämmen. Am häufigsten wurden grampositive Kokken nachgewiesen (109 Isolate), mit Überwiegen von Koagulase-negativen Staphylokokken (52 %) und *Enterococcus* spp. (36 %). In 39 Isolaten wurden gramnegative Bakterien nachgewiesen, mit Überwiegen von Enterobakterien (21 Isolate) und nichtfermentierenden Stäbchen (14 Isolate).

Während der ersten postoperativen Woche wurden in den Galleproben von 59 Patienten 36 Bakterienstämme nachgewiesen: 31 grampositive (86 %) und 5 gramnegative Bakterien (14 %). Von Beginn der zweiten Woche bis zum Ende der vierten Woche wurden in den Galleproben von 65 Patienten 120 Bakterienstämme nachgewiesen: 86 grampositive (72 %) und 28 gramnegative Bakterien (28 %). Einige multiresistente Bakterienstämme wurden ebenfalls nachgewiesen. Unter den nachgewiesenen *Staphylococcus* spp. waren 75 % Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und 88 % Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokken (MRCNS). Unter den Enterokokken dominierten mit 92 % die mit einer hochgradigen Resistenz gegen Aminoglykoside (Kawecki et al., 2007).



## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Wie in der Einleitung gezeigt wurde, sind Infektionen die Hauptursache für Morbidität und Letalität nach Lebertransplantationen. Auf eine Lebertransplantation wartende Patienten leiden bis auf wenige Ausnahmen (akutes Leberversagen) unter einer chronischen Lebererkrankung. Daher ist davon auszugehen, dass die vorgeschädigte Leber teilweise mit pathogenen Keimen besiedelt ist. Diese Keime können während der Transplantation ausgeschwemmt werden oder bereits an anderen Stellen des Körpers vorliegen. Durch die an die Transplantation anschließende Immunsuppression können diese reaktiviert werden. Durch ihren frühzeitigen Nachweis könnte die nachfolgende Therapie schneller und effektiver einsetzen und so die Morbiditäts- und Letalitätsrate verringert werden. Erschwerend kommt bei immunsupprimierten Patienten hinzu, dass die Immunantwort auf Infektionen abgeschwächt stattfindet und zu verringerten klinischen Zeichen führt. Häufig werden Infekte erst im fortgeschrittenen Stadium festgestellt, was dann ein umso schnelleres Handeln erforderlich macht (Fishman et al., 2012b).

Es gibt aktuell allerdings kaum Daten zu Prävalenz, mikrobiologischem Spektrum und Antibiotikaresistenzen von Keimbesiedlung von Galle und Leber bei leberkranken Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation.

Die vorliegende Arbeit untersucht daher die folgenden Fragestellungen: Können in Lebergewebe oder Galle, der in dieser Studie untersuchten Patienten, zum Zeitpunkt der Transplantation Bakterien und Pilze nachgewiesen werden?

Für den Fall einer positiven Antwort sollen außerdem folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Wie viel Prozent der Patienten sind davon betroffen?
- Um welche Erreger handelt es sich dabei?
- Wie sehen die Antibiotika- bzw. Antimykotikaresistenzen der gefundenen Bakterien bzw. Pilze aus?
- Gibt es Patientengruppen bei denen besonders häufig Bakterien und/oder Pilze in Leber und/oder Gallenwegen zu finden sind?

- Mit welchem Nachweisverfahren (Kultur versus PCR-Analyse) können in Leber und Galle vorliegende Erreger am besten erfasst werden?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patienten

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 52 Patienten zusammen, die zwischen Oktober 2010 und Oktober 2011 am Universitätsklinikum Essen lebertransplantiert wurden. Für die Studie wurden bei jedem Patienten eine Biopsie aus der explantierten Leber und wenn möglich eine Gallenpunktion der explantierten Leber durchgeführt. Insgesamt wurden 52 Leberbiopsien und 36 Gallenblasenpunktate gewonnen. Der Grund für die unterschiedliche Anzahl an Leberbiopsien und Gallenblasenpunktaten liegt darin, dass es teilweise bei fehlender oder stark geschrumpfter Gallenblase durch Voroperationen oder Gallengangatresie unmöglich war eine Gallenaspiration durchzuführen.

Mittels eines für die Studie konzipierten Erhebungsbogens (Abbildung 3) wurden verschiedene Patientendaten durch Akteneinsicht erfasst. Diese wurden anhand des klinikinternen EDV Programm medico/s (Fa. Siemens Medical Solutions, Siemens AG, München, Deutschland) ergänzt.

#### **Patientenerfassungsbogen**

Patientenaufkleber

Name, Vorname

Geburtsdatum

Diagnose:

Datum der LTX (Lebertransplantation):

Antibiotika / Antimykotika:

- Antibiotikagabe in letzten 3 Tagen vor der LTX:
- Antimykotikagabe in letzten 3 Tagen vor der LTX:
- Antibiotikagabe während der LTX:
- Antimykotikagabe während der LTX:

Abbildung 3: Patientenerfassungsbogen

Laborparameter:

- $\gamma$ -GT (letzter Wert vor LTX):
- CRP (letzter Wert vor LTX):
- Blutkultur / Blut PCR innerhalb von 7 Tagen vor / nach LTX:

Sonstiges:

- Fieber in letzten 3 Tagen vor LTX:
- Lebendspende oder Verstorbemenspende:
- Tod innerhalb von 3 Monaten nach LTX:

Entnommenes Gewebe:

- |         |    |      |
|---------|----|------|
| • Leber | ja | nein |
| • Galle | ja | nein |

**Fortsetzung Abbildung 3: Patientenerfassungsbogen**

Die Studie lag der Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen zur Prüfung vor, die ihr Einverständnis zur Durchführung gegeben hat.

### **3.2 Probengewinnung**

Die Probenentnahme wurde unter sterilen Bedingungen im Operationssaal durchgeführt. Sie erfolgte spätestens eine Stunde nach Explantation der Leber. Um eine Kontamination des Lebergewebes durch auf die Leberoberfläche übergetretene Bakterien und Pilze zu verhindern, wurden die Biopsien unter Verwendung eines sterilen Skalpells und einer sterilen chirurgischen Pinzette aus dem Inneren der Leber gewonnen. Dadurch konnte Gewebe gewonnen werden, das nicht mit Bakterien und Pilzen aus der Umgebung kontaminiert war. Mögliche Kontaminationsquellen könnten Gegenstände, das Personal, der Patient selbst und die Raumluft sein. Die Gallenpunktionen wurden mit einer sterilen Spritze und Kanüle durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in strahlensterilisierte Gefäße (Polystyrol Mehrzweckgefäße mit Schnappdeckel von Greiner Bio One International AG, Volumen: 14 ml, Maße: 24,5 x 40 mm, Katalog Nummer: 203170) gegeben, welche im Falle der Leberbiopsien mit 10 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung aufgefüllt

wurden. Damit wurde ein Austrocknen des Gewebes verhindert. Die aspirierte Galle wurde nicht verdünnt.

### **3.3 Probentransport und -aufbewahrung**

Während der Routinearbeitszeiten des Institutes für Medizinische Mikrobiologie (Montag bis Freitag von 7:30 bis 16:00 Uhr) wurden die Proben ohne Verzögerung dort abgegeben und direkt untersucht. Außerhalb dieser Zeiten wurden die Proben im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, bis das Labor seine Routinetätigkeit wieder aufnahm.

### **3.4 Kultureller Nachweis von Bakterien und Pilzen**

Die Proben wurden ohne Zeitverzögerung auf das Vorhandensein von Bakterien und Pilzen untersucht. Jede Gewebeprobe wurde steril aufbereitet und gemäß den Standard Verfahrensanweisungen für Gewebe angelegt. Hierbei wurden unter Zuhilfenahme von Ösen verschiedene Nährmedien mit einem kleinen Stück Lebergewebe und soweit vorhanden mit Galle beimpft. Diese wurden anschließend inkubiert.

#### **3.4.1 Schritt 1 – Beimpfung der Nährmedien**

Zunächst wurden ein Kochblutagar, ein Malzagar und eine anaerobe BHI Bouillon mit jeder Probe beimpft. Tabelle 1 zeigt die Art der Inkubation, deren Dauer sowie die Ablesungsintervalle.

**Tabelle 1: Schritt 1 - Beimpfung der Nährmedien**

<b>Nährmedium</b>	<b>Inkubation</b>	<b>Dauer</b>	<b>Ablesen nach</b>
Kochblutagar	36 ± 1 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	48 h	24 h und 48 h
Malzagar	36 ± 1 °C, Raumluft für 3 Tage, danach 7 weitere Tage bei Raumtemperatur	10 Tage	48 h
BHI anaerob	36 ± 1 °C, anaerob (GasPak® Generator)	48 h, bei Trübung bis 7 Tage	48 h

### 3.4.2 Schritt 2a - Vorgehen bei klarem Nährmedium

Bei klarem Nährmedium nach 48 h wurden weitere Ausstriche auf Kochblutagar, Cystein Blutagar und KV-Agar vorgenommen. Tabelle 2 sind die Art der Inkubation, deren Dauer und die Ablesungsintervalle zu entnehmen.

**Tabelle 2: Schritt 2a - Vorgehen bei klarem Nährmedium**

Nährmedium	Inkubation	Dauer	AbleSEN nach
Kochblutagar	36 ± 1 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	48 h	48 h
Cystein Blutagar	36 ± 1 °C, anaerob (GasPak® Generator)	72 h	48 h und 72 h
KV-Agar	36 ± 1 °C, anaerob (GasPak® Generator)	72 h	48 h und 72 h

### 3.4.3 Schritt 2b – Vorgehen bei trübem Nährmedium

Bei trübem Nährmedien nach spätestens 48 h wurden weitere Ausstriche auf Columbia-Blutagar, Kochblutagar, Brilliance Selektivagar, MacConkey-Agar, Cystein-Blutagar und KV-Agar vorgenommen. Tabelle 3 sind die Art der Inkubation, deren Dauer und die Ablesungsintervalle zu entnehmen.

**Tabelle 3: Schritt 2b - Vorgehen bei trübem Nährmedium**

Nährmedium	Inkubation	Dauer	AbleSEN nach
Columbia-Blutagar	36 ± 1 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	48 h	48 h
Kochblutagar	36 ± 1 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	48 h	24 h und 48 h
Brilliance Selektivagar	36 ± 1 °C, Raumluft	48 h	48 h
MacConkey-Agar	36 ± 1 °C, Raumluft	48 h	48 h
Cystein Blutagar	36 ± 1 °C, anaerob (GasPak® Generator)	72 h	48 h und 72 h

KV-Agar	36 ± 1 °C, anaerob (GasPak® Generator)	72 h	48 h und 72 h
---------	---	------	---------------

Eine Übersicht über alle verwendeten Nährmedien und deren Einsatzbereiche ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Übersicht über alle eingesetzten Nährmedien** (Hersteller aller Nährmedien: Oxoid Deutschland, GmbH, Wesel)

Name	Genaue Artikelbezeichnung	Medium geeignet für
Columbia-Blutagar	Columbia Agar mit Schafblut	Anspruchsvolle Keime
Kochblutagar	Schokoladen Agar mit Vitox	Anspruchsvolle Keime (z.B. Haemophilus, Neisseria, Streptococcus pneumoniae)
MacConkey-Agar	MacConkey Nährboden Nr. 3	Coliforme Bakterien, Shigellen, Salmonellen
Brilliance Selektivagar	Brilliance™ Candida	Candida spp.
Malzagar	Malt extract agar	Hefen und Schimmelpilze
BHI anaerob	Schaedler Lösung mit Hämin und Vitamin K	Anaerobe Bakterien
Cystein Blutagar	Hefeextrakt Cystein Agar mit Schafsblut (nach Beerens)	Anaerobe Bakterien
KV-Agar	Schaedler KV Selektivagar mit lysiertem Pferdeblut (mit Hämin und Vitamin K)	Anaerobe, gramnegative Bakterien

### 3.4.4 Schritt 3 – Identifikation der Erreger und Erstellung des Antibiotogramms

Bei Bakterien- oder Pilzwachstum wurden Reinkulturen angelegt und diese weiter inkubiert. Aus diesen konnte anschließend die Keimidentifizierung erfolgen. Diese erfolgte überwiegend über die Zell- und Koloniemorphologie, über biochemische

Testverfahren und unter Anwendung von halbautomatischen Systemen (Vitek 2, bioMérieux und Walkaway, Siemens).

### **3.5 Real Time PCR**

Insgesamt wurden Proben von 24 Patienten mithilfe einer Real Time PCR untersucht. In 23 Fällen handelte es sich dabei um eine Leberbiopsie und in einem Fall um Galle. Die ersten sechs PCRs wurden mit Lebergewebe durchgeführt, das nach der Gewebeentnahme sofort bei -80 °C eingefroren worden war. Im längsten Fall war das Gewebe etwa drei Monate eingefroren, im kürzesten Fall fast zwei Monate. Die Proben wurden in gefrorenem Zustand an das Labor geschickt und dort kontrolliert aufgetaut, um Zellschäden zu vermeiden.

Bei allen weiteren Real Time PCRs wurde das Gewebe direkt nach Entnahme auf einem Puffermedium bei Raumtemperatur an das molekularpathologische Labor in Gelsenkirchen geschickt.

Für die Untersuchung der Proben wurde der UMD<sup>TM</sup> Universal (Molzylm, Bremen) (Kuhn et al., 2011) verwendet. Er basiert technisch auf dem SepsisTest<sup>TM</sup> (Molzylm, Bremen, Wellinghausen et al., 2009), der zur Untersuchung von Vollblut verwendet wird.

Dabei handelt es sich um einen molekularbiologischen Breitband-Test, der die direkte Keimidentifizierung von mehr als 345 Bakterien und Pilzen erlaubt. Es ist keine vorherige kulturelle Anreicherung nötig. Laut Hersteller kann eine Vielzahl von Proben, wie zum Beispiel Vollblut, Liquor, Sputum, Gewebe und Biopsien mit UMD<sup>TM</sup> untersucht werden. Alle für die PCR-Analyse nötigen Reagenzien befinden sich in einem Kit.

Bei der Bearbeitung der Gewebeproben und den daraus entstehenden PCR Ansätzen wurde großer Aufwand betrieben, um keine Kontamination zuzulassen. Es wurde ausschließlich unter zuvor UV bestrahlten Werkbänken gearbeitet, die benötigten Reagenzien und Tuben wurden immer nur so kurz wie möglich geöffnet und es wurde möglichst vorsichtig pipettiert, um die Bildung von Aerosolen zu verhindern. Es kamen ausschließlich DNA freie Pipettenspitzen sowie DNA freie Plastikwaren zum Einsatz.



### **3.5.1 Schritt 1 - DNA Extraktion durch MolYsis™**

Um eine PCR-Analyse durchführen zu können, muss zunächst die DNA aus dem zu untersuchenden Material extrahiert werden. Dazu findet zunächst eine mechanische Zerkleinerung der Proben statt. Anschließend wird ein chaotroper Puffer (CM Puffer) zugegeben, der die in der Probe vorhandenen menschlichen Zellen selektiv lysiert. Die so frei vorliegende humane DNA kann nun durch Zugabe von MolDNase (Molzym) verdaut werden, während die intakte lebende oder tote bakterielle DNA noch von der Zellwand geschützt vorliegt und somit nicht abgebaut werden kann. Dadurch wird das Auftreten von falschen Ergebnissen durch unspezifische Primerbindungen durch humane DNA minimiert (Handschur et al., 2009). Möglicherweise vorliegende bakterielle freie DNA wird in diesem Arbeitsschritt ebenfalls abgebaut.

Außerdem werden durch MolDNase möglicherweise vorhandene PCR Inhibitoren abgebaut (Gebert et al., 2008, Disqué et al., 2006). Das Lysat wird zentrifugiert und der Überstand abgegossen, um eine höhere Konzentration an Pathogenen zu erhalten. In einem weiteren Schritt kann nun die Lyse der Bakterien und Pilze durchgeführt werden. Durch Zugabe von BugLysis (Molzym) werden die Zellwände der Pathogene aufgebrochen. Anschließend wird zur Freisetzung der Nukleinsäuren Proteinase K hinzugegeben. Eine Zusammenfassung der Arbeitsabläufe ist in Abbildung 4 gezeigt.

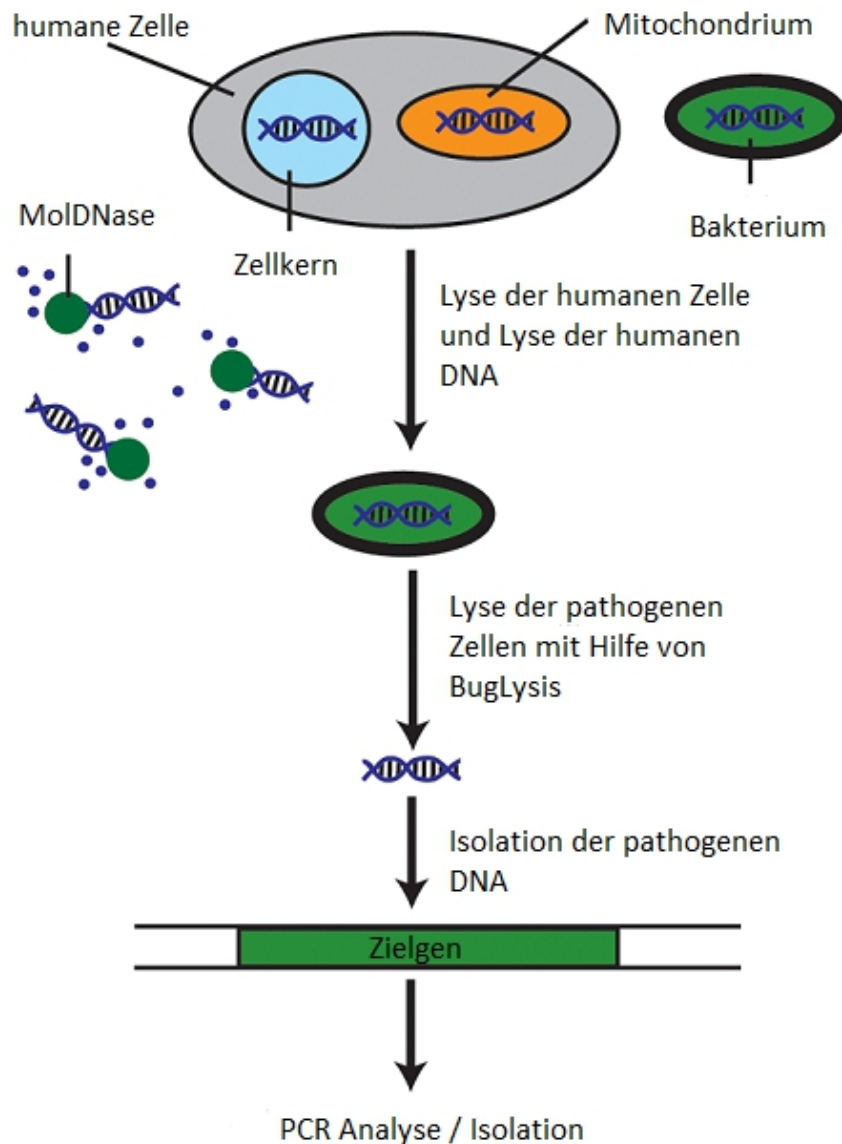


Abbildung 4: DNA Extraktion mithilfe von MolYsis™, (Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Molzym)

### 3.5.2 Schritt 2 - Nachweis pathogener DNA mittels Real Time PCR

UMD™ Universal basiert auf der molekularen Identifizierung des 16S rDNA Gens für Bakterien und des 18S rDNA Gens für Pilze. Das 16S rDNA Gen umfasst in etwa 1500 Basenpaare. Bestimmte Sequenzabschnitte sind für die meisten Mikroorganismen identisch. Ein etwa 500 Basenpaar großer variabler Sequenzabschnitt ist für die Mehrheit der bekannten Bakterien spezifisch. Dies macht die Anwendung des hier beschriebenen Verfahrens möglich (Keller et al., 2010).

Für die Identifizierung der beschriebenen Gene muss eine ausreichende Menge an Nukleinsäuren vorhanden sein. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Amplifikation (Vermehrung) von Nukleinsäuren. Sie benötigt doppelsträngige DNA mit einem bekannten Sequenzteilabschnitt, wie es bei 16S rDNA und 18S rDNA der Fall ist. UMD<sup>TM</sup> Universal verwendet universelle Primer.

Zum Nachweis pathogener DNA wurde in unserer Studie die Real Time PCR genutzt. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, das auf der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnen DNA ermöglicht. Dies geschieht durch Fluoreszenzdetektion unter Verwendung einer zugesetzten DNA Anfärbelösung.

Die isolierte DNA wurde mit den benötigten Primern, der DNA Polymerase (MolTaq 16S, Molzym, Bremen), Nukleotiden, Puffern und einer Anfärbelösung (DS – DNA staining solution, Molzym, Bremen) zusammengegeben. Der so hergestellte PCR Ansatz wurde anschließend in Glaskapillaren pipettiert und in den Roche LightCycler® 1.5 gesetzt, der automatisch mehrere Zyklen zur Vermehrung von DNA durchläuft. Ein Zyklus sieht wie folgt aus:

- **Denaturierung:** die doppelsträngige DNA (dsDNA) wird durch Erhitzen auf 94 °C denaturiert, wodurch DNA Einzelstränge (ssDNA) entstehen.
- **Primer Annealing:** Anlagerung der Primer als Startermoleküle für die folgende Extension an das 5'-Ende der Gensequenz.
- **Extension:** Die Polymerase synthetisiert mithilfe der im PCR Ansatz enthaltenden Nukleotide vom Primer ausgehend in 5'→3'-Richtung den komplementären Strang der DNA.

Es wurden zwei getrennte Ansätze jeweils für Bakterien und Pilze angesetzt. Es kamen Mastermix Ma Bac (Molzym, Bremen) für Bakterien und Mastermix Ma Yeast (Molzym, Bremen) für Pilze zum Einsatz. Die Vorbereitung der Mastermixe und die anschließende Durchführung der PCR-Analyse fanden unter zuvor UV bestrahlten Werkbänken statt, um ein kontaminationsfreies Arbeiten zu gewährleisten. Außerdem trug das Laborpersonal Kittel, Überschuhe und sterile Handschuhe, die regelmäßig gewechselt wurden.

Bereits während der Amplifikation wird eine mögliche Akkumulation des PCR Produktes durch die Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar. Die PCR Produkte werden bei Nutzung von UMD Universal durch SYBR Green detektiert, was an die Doppelstrang DNA bindet. Bei steigender Menge des PCR Produktes kommt es zu einem proportionalen Anstieg der Fluoreszenz, die während jedes Zyklus gemessen wird.

Bei allen PCR-Analysen wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt. Erstere ist nötig, um Auskunft zu erhalten, ob die Untersuchung korrekt durchgeführt worden ist, also ob richtig pipettiert wurde und die Reaktion prinzipiell funktioniert hat. Die Negativkontrolle zeigt, ob es zu einer Kontamination bei der Vorbereitung oder Durchführung der PCR-Analyse gekommen ist, also ob sauber gearbeitet wurde oder ob falsch positive Ergebnisse zu erwarten sind.

### **3.5.3 Schritt 3 - DNA Sequenzierung**

Bei positivem Real Time PCR Ergebnis wurde eine direkte Sequenzierung des Amplifikats nach Sanger mit einem Sequenzierungsgerät (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) aus dem Ansatz der Real Time PCR durchgeführt. Dadurch konnte die Identität des detektierten Pathogens gefunden werden. Für die Sequenzierung von Bakterien wurden zwei verschiedene Primer verwendet: SeqGP16 für grampositive Bakterien und SeqGN16 für gramnegative Bakterien. Für die Sequenzierung von Pilzen kam SeqYeast18 zum Einsatz.

### **3.5.4 Schritt 4 - DNA Sequenz Auswertung**

Die erhaltenen Sequenzierungsergebnisse wurden mittels einer Datenbank-Abfrage mit Sequenzen bekannter Mikroorganismen verglichen und dadurch identifiziert. Dabei wurde das Programm von der Homepage [www.sepsitest-blast.de](http://www.sepsitest-blast.de) verwendet. Bei zu niedriger Menge des Amplifikats findet keine Sequenzreaktion statt und das Ergebnis der Untersuchung wird als negativ betrachtet. Wenn die SepsiTst-BLAST Analyse eine niedrige Qualität der Sequenz anzeigt, besteht die Möglichkeit sich überschneidender Sequenzen durch mehr als ein vorhandenes Pathogen. In diesen Fällen bietet Molzym einen Service zur Identifikation der Pathogene unter [www.ripseq.com](http://www.ripseq.com) an.

Abbildung 5 zeigt ein Übersichtsschema zur Identifizierung von Pathogenen mit UMD<sup>TM</sup> Universal.

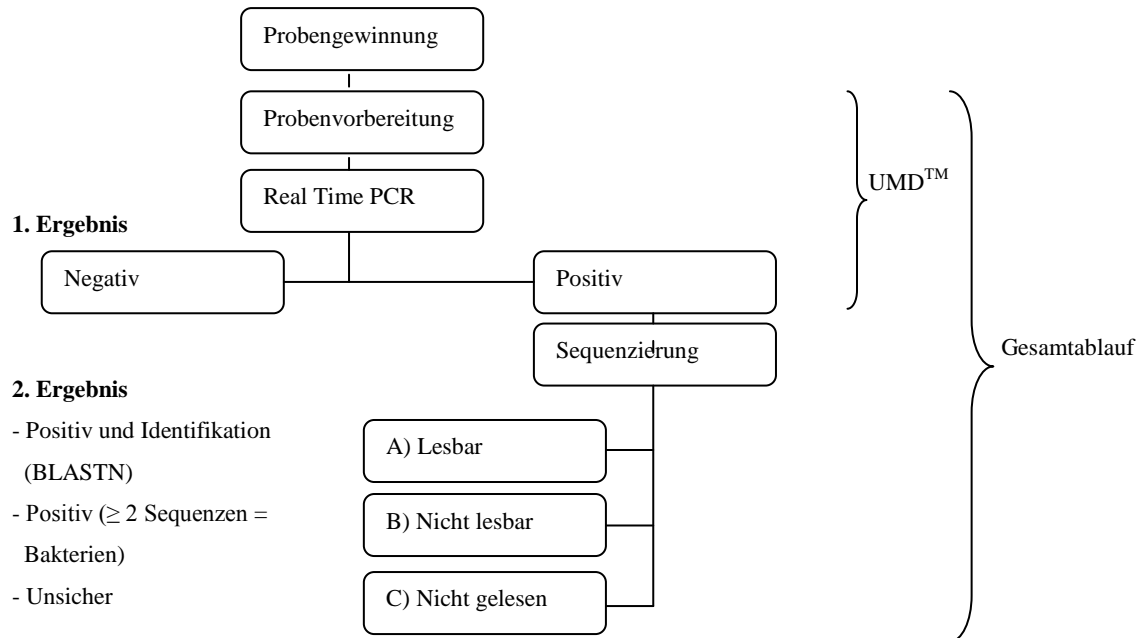


Abbildung 5: Nachweis und Identifizierung von Bakterien (Pilze analog) mit UMD<sup>TM</sup>-Universal und Sequenzierung, (Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Molzym)

## **4 Ergebnisse**

Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich wie folgt: Im ersten Teil wird das in die Studie eingeschlossene Patientenkollektiv beschrieben. Anschließend werden die Ausgangsbedingungen unter denen die einzelnen Transplantationen stattgefunden haben beschrieben.

Im dritten Teil werden die Ergebnisse der verschiedenen Methoden („Kultur“ und „PCR-Analyse“) zum Nachweis von Bakterien und Pilzen dargestellt. In den darauf folgenden Unterkapiteln werden ein Methodenvergleich zwischen „Kultur“ und PCR-Analyse“, die Ergebnisse der Erregerdiagnostik des Blutes, die Befunde aus der Pathologie zu histologischen Zeichen von Cholangitiden und die Dreimonatsletalität nach Lebertransplantation diskutiert.

### **4.1 Patientenkollektiv**

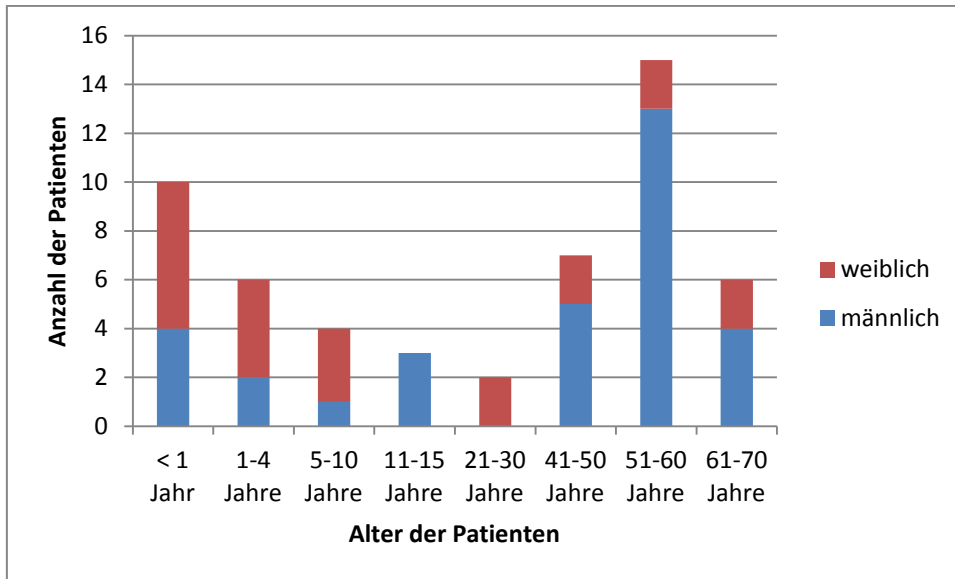
Die prospektive Studie erfasst Patienten, die im Zeitraum von Oktober 2010 bis Oktober 2011 eine Lebertransplantation im Essener Universitätsklinikum erhielten. Hierbei wurden insgesamt 52 Patienten eingeschlossen.

#### **4.1.1 Alter und Geschlecht bei Transplantation**

Bei den transplantierten Patienten handelte es sich bei 22 von 52 Patienten (42 %) um Säuglinge, Kinder oder Jugendliche und bei den restlichen 30 Patienten (58 %) um Erwachsene (18 Jahre und älter). Der jüngste Patient war bei der Transplantation 5 Monate und 23 Tage alt und der älteste Patient 70 Jahre. In der Altersgruppe zwischen 51 und 60 Jahren befanden sich 15 Patienten (29 %) und in der Altersgruppe kleiner 1 Jahr befanden sich 10 Patienten (19 %). Diese beiden Gruppen stellten somit den größten Anteil an dem Gesamtkollektiv.

Von den 52 Patienten waren 20 Personen (38,5 %) weiblich und 32 Personen (61,5 %) männlich. Unter den Kindern und Jugendlichen überwiegen knapp die weiblichen Patienten, wohingegen unter den erwachsenen Patienten deutlich das männlich Geschlecht überwiegt.

Die genaue Alters- und Geschlechtsverteilung der lebertransplantierten Patienten ist in Abbildung 6 gezeigt.



**Abbildung 6: Alters- und Geschlechtsverteilung der lebertransplantierten Patienten (in absoluten Häufigkeiten)**

#### 4.1.2 Indikationen zur Lebertransplantation

Eine Vielzahl von Diagnosen führte bei den in der Studie eingeschlossenen Patienten zur Lebertransplantation.

Häufigste Diagnose war die Gallengangatresie, die bei 12 Patienten (23,1 %) eine Transplantation nötig machte.

Bei 2 Patienten (3,8 %) war die sklerosierende Cholangitis (PSC) Grund der Transplantation und bei 1 Patient (1,9 %) die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ II.

11 Patienten (21,2 %) mussten aufgrund einer alkoholinduzierten Leberzirrhose transplantiert werden.

Maligne Tumoren führten zusammengefasst zu 9 Transplantationen (17,3 %). Dazu gehörten 7 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom und jeweils 1 Patient mit Hepatoblastom und embryonalem Sarkom der Leber.

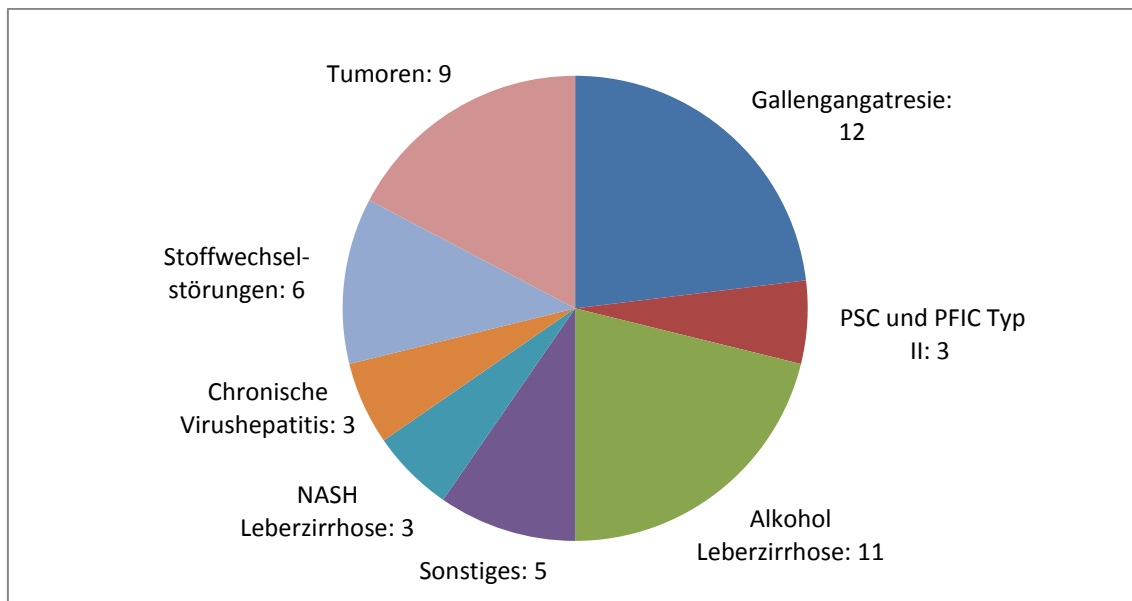
Aufgrund von Stoffwechselstörungen wurden 6 Patienten (11,5 %) transplantiert. Dazu zählten 3 Patienten mit Hyperoxalurie Typ I und jeweils 1 Patient mit Alpha1-Antitrypsinmangel, Glykogenose und Mukoviszidose.

Eine chronische Virushepatitis lag bei 3 Patienten (5,8 %) vor, in 1 Fall eine chronische Hepatitis B und in 2 Fällen eine chronische Hepatitis C.

Bei 3 Patienten (5,8 %) wurde eine Lebertransplantation aufgrund einer NASH Leberzirrhose durchgeführt.

Unter Sonstiges wurden 5 Patienten (9,6 %) zusammengefasst. Dazu gehörten 3 Patienten mit Leberversagen unklarer Genese und jeweils 1 Patient mit Joubert Syndrom und Zystischer Lebererkrankung.

Abbildung 7 sind alle Indikationen zur Lebertransplantation zu entnehmen.



**Abbildung 7: Indikationen zur Lebertransplantation (in absoluten Häufigkeiten);** PSC: primär sklerosierende Cholangitis, PFIC: progressive familiäre intrahepatische Cholestase

#### 4.1.3 Cholestatische versus nicht cholestatische Lebererkrankungen

Lebererkrankungen lassen sich in cholestatisch und nicht cholestatisch unterteilen. Die Gallengangatresie, die primäre sklerosierende Cholangitis und die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ II werden zu den cholestatischen Lebererkrankungen gezählt. In dieser Studie wurde bei 17 Patienten (32,7 %) die Indikation zur Lebertransplantation aufgrund einer cholestatischen Lebererkrankung gestellt. Zu den nicht cholestatischen Lebererkrankungen gehören das akute Leberversagen unklarer Genese, die chronische Virushepatitis, die alkoholinduzierte Leberzirrhose, die NASH Leberzirrhose, sämtliche die Leber betreffenden Stoffwechselstörungen, maligne Tumoren, zystische Lebererkrankungen und das Joubert Syndrom. Aufgrund nicht cholestatischer Lebererkrankungen wurde bei 35 Patienten (67,3 %) die Indikation zur



Lebertransplantation gestellt. Es muss allerdings erwähnt werden, dass auch nicht cholestatische Lebererkrankungen häufig eine cholestatische Komponente haben.

## **4.2 Ausgangsbedingungen vor Transplantation**

Die Lebertransplantationen und damit die Probenentnahmen fanden unter verschiedenen Umständen statt. In einigen Fällen fand eine Lebendspende statt, in anderen eine Verstorbenenspende, manche der Patienten hatten präoperativ Fieber oder erhöhte Cholangitisparameter, andere wiederum nicht, um nur einige Punkte zu nennen. In den folgenden Absätzen wird auf diese Faktoren genauer eingegangen.

### **4.2.1 Lebendspende und Verstorbenenspende**

Es besteht einerseits die Möglichkeit eine Lebertransplantation mit dem Organ eines verstorbenen Menschen durchzuführen oder aber eine Lebersegment-Lebendspende durchzuführen. Von den 52 Patienten erhielten 12 Patienten (23,1 %) eine Lebendspende. Bei allen Empfängern einer Lebendspende handelte es sich um Kinder. Die übrigen 40 transplantierten Patienten (76,9 %) erhielten eine Verstorbenenspende.

### **4.2.2 Fieber vor Transplantation**

Bei vier Patienten (7,7 %) lag in den letzten drei Tagen vor der Operation Fieber vor. Davon wurde ausgegangen, wenn die Körperkerntemperatur bei mindestens einer Messung über 38,5 °C betrug.

### **4.2.3 Laborparameter vor Transplantation**

Sowohl bei CRP als auch bei  $\gamma$ -GT handelt es sich um typische Cholangitisparameter. Erhoben wurde jeweils der letzte präoperative Wert. In den allermeisten Fällen fand die letzte Blutabnahme wenige Stunden vor der Transplantation statt. Falls CRP bzw.  $\gamma$ -GT nicht am Tag der Transplantation oder am Vortag bestimmt worden waren, wurden die entsprechenden Laborparameter nicht in die Auswertung aufgenommen. Zur Einordnung in die Kategorien „normal“, „leicht erhöht“ und „stark erhöht“ wurden die Referenzbereiche des Zentrallabors des Universitätsklinikums Essen für die einzelnen Altersgruppen und Geschlechter übernommen.

Bei 51 Patienten (98,1 %) konnte ein präoperativer  $\gamma$ -GT Wert erhoben werden. Bei 13

Patienten (25,5 %) befand sich dieser in den entsprechenden Referenzbereichen. 16 Patienten (31,4 %) zeigten leicht erhöhte und 22 Patienten (43,1 %) stark erhöhte präoperative  $\gamma$ -GT Werte.

Bei 40 Patienten (76,9 %) konnte ein präoperativer CRP Wert ermittelt werden. In keinem Fall lag ein stark erhöhter CRP Wert vor. 12 Patienten (30 %) hatten ein normales CRP und 28 Patienten (70 %) ein leicht erhöhtes CRP.

#### **4.2.4 Präoperative Antibiotikagabe**

Für jeden Patienten wurde erhoben, ob in den letzten drei Tagen vor der Transplantation eine Antibiotikatherapie durchgeführt wurde und wenn ja mit welchem Antibiotikum. Bei 22 Patienten (42,3 %) war dies der Fall. Dabei wurde bei der Erfassung der Daten kein Unterschied zwischen Patienten gemacht, die an allen drei präoperativen Tagen eine entsprechende Medikation erhalten hatten und Patienten, die nur an einem oder zwei Tagen eine Antibiose erhalten hatten. 30 Patienten (57,7 %) erhielten keine Antibiotikatherapie in den letzten drei Tagen vor ihrer Lebertransplantation. Am häufigsten kam die Kombination aus Ampicillin und Cefotaxim zum Einsatz (5 Patienten, 22,7 %), gefolgt von Neomycin (4 Patienten, 18,2 %). Des Weiteren wurden die in Tabelle 5 genannten Antibiotika bzw. Antibiotikakombinationen eingesetzt.

**Tabelle 5: Präoperativ eingesetzte Antibiotika**

<b>Antibiotika</b>	<b>Anzahl Patienten</b>
Ampicillin und Cefotaxim	5
Neomycin	4
Sulfamethoxazol und Trimethoprim	2
Cefotaxim, Piperacillin/Tazobactam und Vancomycin	1
Ciprofloxacin	1
Vancomycin	1
Ampicillin, Cefotaxim, Sulfamethoxazol und Trimethoprim	1
Ampicillin, Cefotaxim und Cefuroxim	1

Amoxicillin, Cefotaxim und Cefuroxim	1
Ciprofloxacin, Piperacillin/Tazobactam und Vancomycin	1
Cefuroxim und Erythromycin	1
Trimethoprim	1
Meropenem	1
Piperacillin/Tazobactam	1
<b>Gesamtzahl der präoperativ mit Antibiotika behandelten Patienten</b>	<b>22</b>

#### 4.2.5 Perioperative Antibiotikagabe

Ebenfalls wurde erhoben, ob und welche Antibiotika während der Operation gegeben wurden. Bis auf 1 Patienten haben alle Patienten eine perioperative Antibiotikaprophylaxe erhalten (51 Patienten; 98,1 %).

Dabei kam eine Vielzahl von Medikamenten zum Einsatz. 39 Patienten (76,5 %) erhielten perioperativ Ampicillin/Sulbactam und 6 Patienten (11,8 %) Ampicillin und Cefotaxim. Die weiteren Medikamente sind Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6: Perioperativ eingesetzte Antibiotika**

<b>Antibiotika</b>	<b>Anzahl Patienten</b>
Ampicillin/Sulbactam	39
Ampicillin und Cefotaxim	6
Ciprofloxacin und Clindamycin	2
Ampicillin/Sulbactam, Meropenem	1
Meropenem	1
Meropenem und Vancomycin	1
Piperacillin/Tazobactam	1
<b>Gesamtzahl der perioperativ mit Antibiotika behandelten Patienten</b>	<b>51</b>

#### **4.2.6 Präoperative Antimykotikagabe**

Für jeden Patienten wurde erhoben, ob in den drei Tagen vor der Transplantation eine Antimykotikatherapie durchgeführt wurde und wenn ja mit welchem Antimykotikum. Lediglich 2 Patienten (3,8 %) hatten in den letzten drei Tagen vor der Transplantation Antimykotika erhalten. Dabei handelte es sich in einem Fall um Amphotericin B, in dem anderen Fall um Fluconazol.

#### **4.2.7 Perioperative Antimykotikagabe**

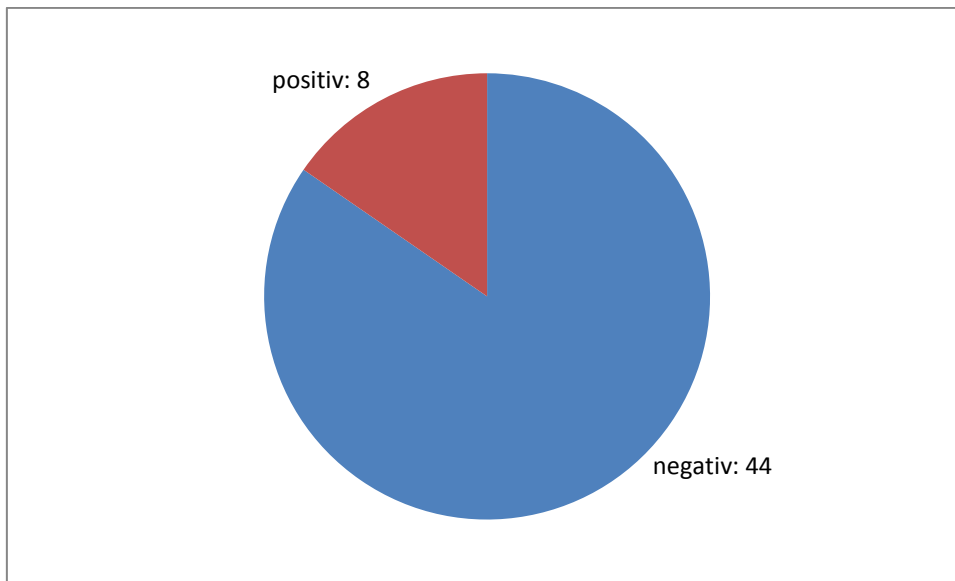
Ebenfalls wurde erhoben, ob und welche Antimykotika während der Operation gegeben wurden. Während der Lebertransplantation erhielt keiner der Patienten ein Antimykotikum.

### **4.3 Erregernachweis**

Bei allen 52 Patienten wurden Leberbiopsien durchgeführt. Wann immer dies möglich war, wurde zusätzlich Gallenflüssigkeit aspiriert. Dies gelang bei insgesamt 36 Patienten (69,2 %). Gründe für ein Nicht-Gelingen der Gallenaspiration waren vor allem eine vorhergehende Cholezystektomie. Das war hauptsächlich bei Kindern mit Gallengangatresie der Fall, da diese bis auf eine Ausnahme vor der Transplantation eine Operation nach Kasai erhalten hatten, bei der die Gallenblase entfernt worden war. Außerdem ist bei Patienten mit Gallengangatresie die Galle durch die Veränderungen in den extrahepatischen Gallengängen stark eingedickt, wodurch es teilweise unmöglich ist, Galle zu aspirieren.

#### **4.3.1 Kulturen der Leberbiopsien**

Bei 8 Patienten (15,4 %) gelang die Kultivierung von Bakterien oder Pilze aus den Leberbiopsien. Bei den übrigen 44 Patienten (84,6 %) konnten keine Bakterien oder Pilze angezüchtet werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Ergebnisse der Kulturen der Leberbiopsien (in absoluten Häufigkeiten)**

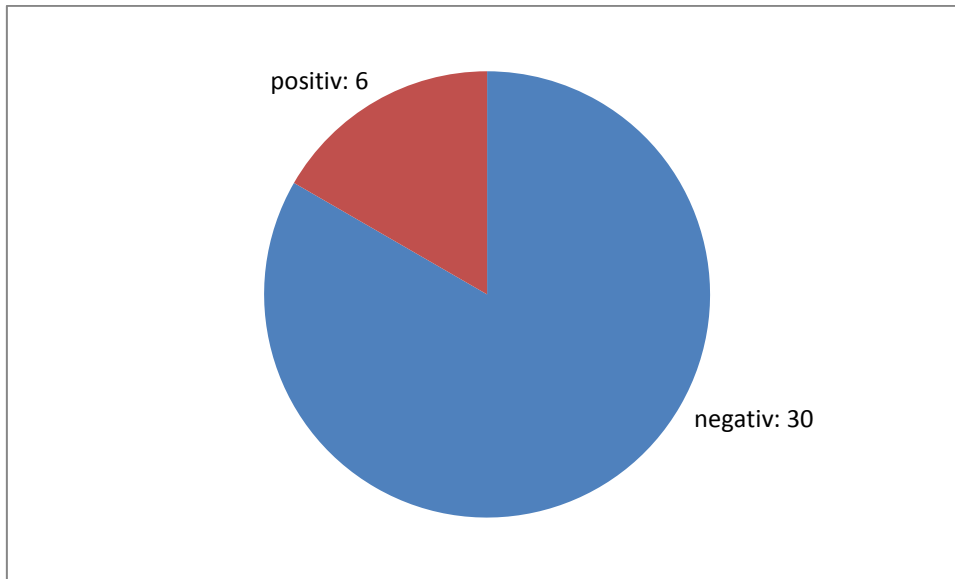
In dem folgenden Abschnitt sind die Kulturergebnisse der positiven Leberbiopsien aufgeführt. Bei zwei Patienten konnten zwei verschiedene Erreger festgestellt werden.

- *Aeromonas hydrophila* (hohe Keimzahl) und *Hafnia alvei* (aus Anreicherung)
- *Escherichia coli* (hohe Keimzahl) und *Klebsiella pneumoniae* (hohe Keimzahl)
- *Staphylococcus haemolyticus* (vereinzelt)
- *Escherichia coli* (hohe Keimzahl)
- *Enterococcus faecalis* (aus Anreicherung)
- *Staphylococcus epidermidis* (vereinzelt)
- *Stenotrophomonas maltophilia* (vereinzelt)
- *Klebsiella pneumoniae* (vereinzelt)

Im Anhang (Kapitel 8.1) sind die Antibiotikaresistenzen zu den einzelnen Befunden zu finden.

#### **4.3.2 Kulturen der Galleaspirationen**

Bei 6 von 36 Patienten (16,7 %) war die Gallenkultur positiv. Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, war also bei den übrigen 30 Patienten (83,3 %) kein Wachstum der Gallenkulturen zu beobachten.



**Abbildung 9: Ergebnisse der Kulturen der Galleaspirationen (in absoluten Häufigkeiten)**

Es konnten die im folgenden Abschnitt genannten Erreger isoliert werden. Bei vier Patienten konnten zwei verschiedene Erreger nachgewiesen werden.

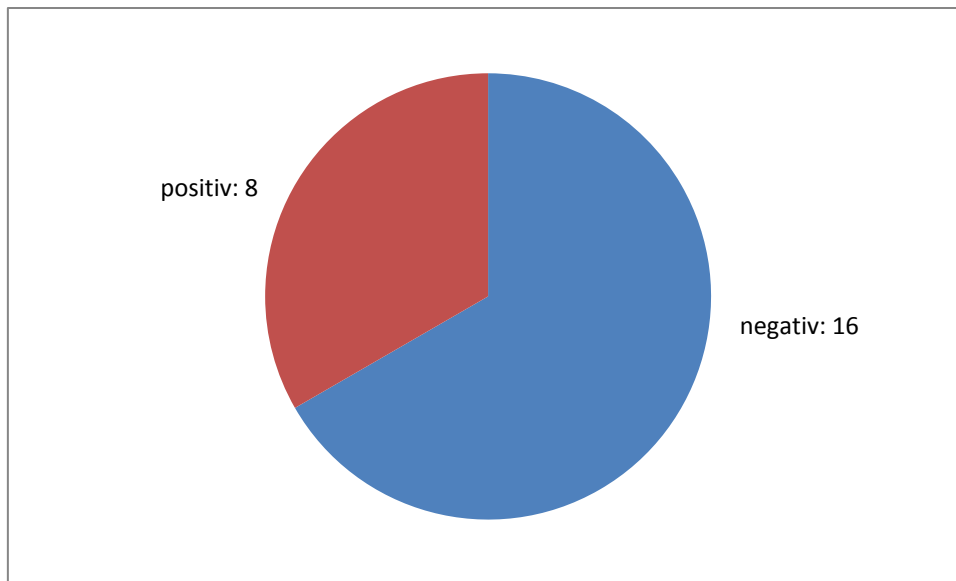
- Staphylococcus epidermidis (hohe Keimzahl) und Candida albicans (hohe Keimzahl)
- Escherichia coli (hohe Keimzahl) und Candida tropicalis (mäßige Keimzahl)
- Escherichia coli (mäßige Keimzahl)
- Pseudomonas aeruginosa (mäßige Keimzahl) und Enterobacter cloacae (geringe Keimzahl)
- Lactobacillus gasseri (geringe Keimzahl)
- Stenotrophomonas maltophilia (hohe Keimzahl) und Klebsiella pneumoniae (geringe Keimzahl)

Im Anhang (Kapitel 8.1 und 8.2) sind die Antibiotika- und Antimykotikaresistenzen zu den einzelnen Befunden aufgeführt.

#### **4.3.3 Real Time PCR**

Bei 24 Patienten (46,2 %) wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Dabei handelte es sich bis auf eine Ausnahme um Kinder. In einem Fall wurde eine PCR-Analyse mit Galle realisiert, bei allen weiteren untersuchten Proben handelte es sich um Leberbiopsate. In 8 Fällen (33,3 %) gelang ein Erregernachweis mittels PCR-Analyse.

Bei den übrigen 16 Untersuchungen (66,7 %) konnte kein Erreger nachgewiesen werden (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Ergebnisse der PCR-Analysen (in absoluten Häufigkeiten)**

Die im folgenden Abschnitt genannten Erreger konnten nachgewiesen werden. Bei mehreren direkt hintereinander genannten Spezies konnten diese auf Sequenzebene nicht differenziert werden:

- *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* (insgesamt sehr starkes Wachstum)
- *Staphylococcus epidermidis/hominis/haemolyticus/capitis* und *Candida albicans* (insgesamt sehr starkes Wachstum)
- *Staphylococcus epidermidis/caprae/capitis* (nur einer von zwei Ansätzen mit spätem Signal positiv)
- *Pichia anomala* (Ansatz mit spätem Signal positiv)
- Sequenz schwach positiv für nichtauswertbare Bakterien
- Ascomycota und Phosporaceae
- Dermacoccaceae
- *Pseudomonas alcaliphila/pseudoalcaligenes/mendocina*

#### 4.4 Methodenvergleich und Antibiotika- bzw. Antimykotikaresistenzen

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist der Vergleich der Ergebnisse der Kulturen mit denen der PCR-Analysen. Dabei soll untersucht werden, welche der beiden Methoden sich besser für die Detektion von Pathogenen in Lebergewebe und Galle eignet. Es gab insgesamt 8 positive PCR-Analysen. In 2 Fällen stimmten die Ergebnisse der PCR-Analyse mit denen der Kultur überein. In 5 Fällen waren die Ergebnisse der Kultur negativ und die der PCR-Analyse positiv und in einem Fall erbrachten PCR-Analyse und Kultur unterschiedliche positive Ergebnisse.

Es gab insgesamt 16 negative PCR-Analysen. Bei 15 Patienten waren die entsprechenden Kulturen ebenfalls negativ und in 1 Fall war die Kultur positiv für *Klebsiella pneumoniae*.

In Tabelle 7 sind die positiven Ergebnisse aller Kulturen und PCR-Analysen zusammengefasst. Außerdem ist die prä- und perioperative Antibiotika- bzw. Antimykotikaphylaxe in dieser Patientengruppe genannt. In der letzten Spalte ist aufgeführt, ob mindestens eines der gegebenen Antibiotika bzw. Antimykotika sensibel gegenüber den identifizierten Bakterien und Pilzen war.

**Tabelle 7: Methodenvergleich und Antibiotika- bzw. Antimykotikaresistenzen;** AB: Antibiotikum; AM: Antimykotikum; N. d.: Nicht durchgeführt; v.: vor Lebertransplantation; w.: während Lebertransplantation; Neg.: Negativ

Patient (siehe Anhang)	Kultur Leber	Kultur Galle	PCR-Analyse	Blutkultur /Blut PCR	AB/AM	AB/AM sensibel
1	<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Hafnia alvei</i>	N. d.	N. d.	<i>Hafnia alvei</i>	Ampicillin + Cefotaxim (v/w)	Ja
2	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	N. d.	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	N. d.	Ampicillin/ Sulbactam (w)	Ja ( <i>E. coli</i> ), Nein ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )
3	Neg.	<i>Staph. epidermidis</i> + <i>C. albicans</i>	<i>Staph. epidermidis</i> + <i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Ciprofloxacin, Piperacillin/ Tazobactam, Vancomycin (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Ja ( <i>Staph. epidermidis</i> )  Nein ( <i>C. albicans</i> )
4	Neg.	N. d.	Neg.	<i>E. faecium</i>	Vancomycin (v)	Ja



5	Neg.	N. d.	Staph. epidermidis	Neg.	Cefotaxim, Piperacillin/ Tazobactam + Vancomycin (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Keine Resistenz- testung vor- handen (PCR)
7	Staph. hae- molyticus	Neg.	N. d.	N. d.	Ciprofloxacin (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Ja
8	E. coli	E. coli + C. tropicalis	N. d.	N. d.	Neomycin (v)  Ampicillin/ Sulbactam+ Meropenem (w)	Ja (E. coli)  Nein (C. tropicalis)
11	Neg.	Neg.	Pichia anomala	Neg.	Ampicillin, Cefotaxim + Cefuroxim (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Keine Resistenz- testung vor- handen (PCR)
14	Neg.	E. coli	N. d.	N. d.	Ampicillin/ Sulbactam (w)	Ja
21	E. faecalis	Neg.	N. d.	N. d.	Neomycin (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Für Resis- tenztestung nicht subkul- tivierbar
26	Neg.	N. d.	Sequenz schwach positiv für nichtaus- wertbare Bakterien	Neg.	Ampicillin + Cefotaxim (v) Fluconazol (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Keine Resistenz- testung vorhanden (PCR)
27	Neg.	Pseudomo- nas aerugi- nosa +Ente- robacter cloacae	Neg.	Neg.	Ampicillin + Cefotaxim (v/w)	Nein
28	Neg.	Lactobacil- lus gasseri	N. d.	N. d.	Neomycin (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Keine Resistenz- testung erfolgt, meist Penicillin sensibel
39	Staph. epidermidis	N. d.	N. d.	N. d.	Ampicillin/ Sulbactam (w)	Ja

40	Neg.	Neg.	Ascomycota + Phosporaceae	Neg.	Piperacillin/ Tazobactam (v/w)	Keine Resistenz- testung vorhanden (PCR)
43	Stenotro- phomonas maltophilia	Stenotro- phomonas maltophilia + Klebsiella pneumoniae	Dermacoc- caceae	Neg.	Cefuroxim + Erythromycin (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Nein (Stenotro- phomonas maltophilia)  Ja (Klebsiella pneumoniae)
45	Neg.	N. d.	Pseudomonas alkaliphila/ pseudoalca- ligenes/ mendocina	Entero- coccus faecium	Trimethoprim (v)  Ampicillin + Cefotaxim (w)	Nein
51	Klebsiella pneumoniae	N. d.	Neg.	N. d.	Ampicillin + Cefotaxim (v)  Ampicillin/ Sulbactam (w)	Nein

#### **4.5 Blutdiagnostik (Kultur/PCR-Analyse) innerhalb von sieben Tagen vor/nach Lebertransplantation**

Bei einem Teil der Patienten wurde vor bzw. nach der Transplantation eine Infektionsdiagnostik des Blutes durchgeführt. Dabei kam entweder der Erregernachweis mittels einer Blutkultur oder einer PCR-Analyse in Frage. Der Übersicht halber werden beide Untersuchungen in diesem Kapitel beschrieben. Blutkulturen aus liegenden Kathetern fanden keine Berücksichtigung, da hierbei die Kontaminationsrate erhöht ist. Bei 4 Patienten (7,7 %) wurde innerhalb von sieben Tagen vor der Transplantation eine Infektionsdiagnostik des Blutes durchgeführt. Dabei handelte es sich ausschließlich um Blutkulturen.

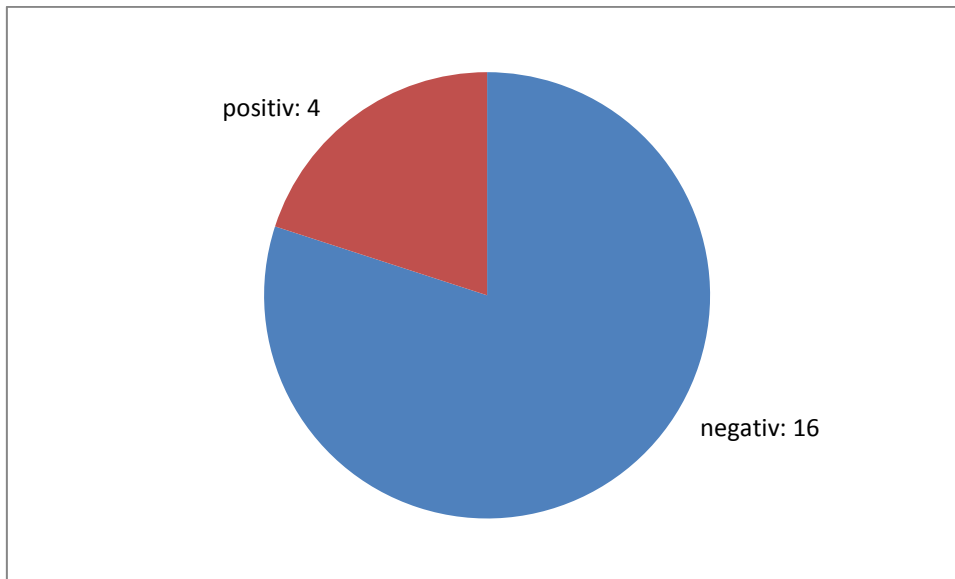
Bei einem von 4 Patienten (25 %) konnte ein Erreger isoliert werden. Es handelte sich dabei um:

- Enterococcus faecium

Im Anhang (Kapitel 8.1) sind die Antibiotikaresistenzen zu diesem Befund aufgeführt.

Bei 20 Patienten (38,5 %) wurde innerhalb von sieben Tagen nach der Transplantation eine Infektionsdiagnostik des Blutes durchgeführt. Bei den restlichen 32 Patienten (61,5 %) traf das nicht zu. Insgesamt wurden 35 Blutkulturen und 8 PCR-Analysen durchgeführt.

Bei 4 von 20 Patienten (20 %) konnte ein Erreger isoliert werden (Abbildung 11). Drei positive Befunde wurden durch Kulturen erlangt, ein weiterer durch eine PCR-Analyse.



**Abbildung 11: Ergebnisse der Blutkulturen/Blut PCRen (in absoluten Häufigkeiten)**

Es konnten die folgenden Erreger isoliert werden:

- Hafnia alvei
- Candida albicans
- Grampositive Stäbchen (mikroskopischer und kultureller Nachweis (für Differenzierung und Keimbestimmung nicht kultivierbar))
- Enterococcus faecium

Sowohl Hafnia alvei als auch Candida albicans waren zuvor im Lebergewebe bzw. in der Galle nachgewiesen worden.

Im Anhang (Kapitel 8.1) sind die Antibiotikaresistenzen zu den einzelnen Befunden zu finden.

#### **4.6 Histologische Zeichen für Cholangitis**

Bei 51 der 52 Patienten (98 %) wurde die explantierte Leber in der Pathologie untersucht. Im Rahmen der Studie wurden die Befunde auf Cholangitis-Zeichen durchgegangen. Das Vorliegen einzelner Entzündungszellen reichte nicht als Kriterium aus, da dies bei einer geschädigten Leber fast immer der Fall ist. Vielmehr wurde nur bei deutlichen Entzündungszeichen im Bereich der Gallenblase bzw. Gallenwege von möglichen Zeichen einer Cholangitis ausgegangen. Bei 15 Patienten (29 %) konnten histologisch Zeichen einer Cholangitis gefunden werden. Bei den übrigen 36 Patienten (71 %) war der Befund negativ

Bei 6 von 15 Patienten (40 %) mit histologischen Zeichen einer Cholangitis konnte tatsächlich ein Erreger in der Leberbiopsie oder Galle nachgewiesen werden, bei den übrigen 9 Patienten (60 %) nicht.

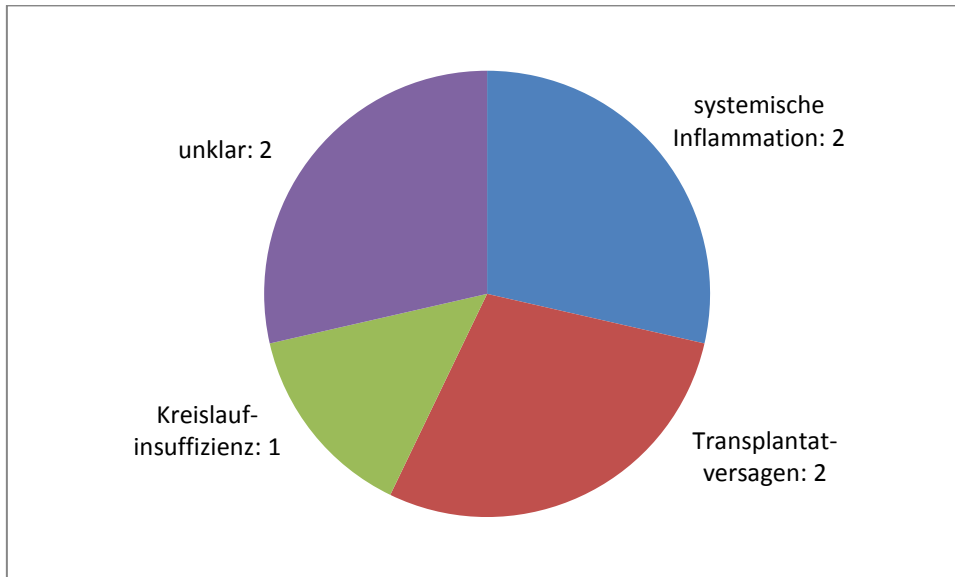
Bei 11 von 36 Patienten (31 %) ohne histologische Zeichen einer Cholangitis war dennoch ein Erregernachweis in der Leberbiopsie oder Galle gelungen, bei den übrigen 25 Patienten (69 %) war das nicht der Fall.

#### **4.7 Dreimonatsletalität**

In einem Zeitraum von 3 Monaten nach den Lebertransplantationen wurde beobachtet, ob die Patienten verstarben. Dies war bei 7 Patienten (14 %) der Fall. Wie Abbildung 12 zeigt, sind 2 Patienten an einer systemischen Inflammation verstorben, 2 weitere an Transplantatversagen. Bei 1 Patienten kam es zu einer nicht beherrschbaren Kreislaufinsuffizienz und 2 Patienten sind aus unklaren Gründen verstorben. Unter den verstorbenen Patienten waren bei 2 (28,6 %) die Leber und in einem Fall zusätzlich die Gallenwege keimbesiedelt.

Bei einem der beiden Patienten wurde kulturell in der Leber *Escherichia coli* und in der Galle *Escherichia coli* und *Candida tropicalis* nachgewiesen. Es war keine PCR-Analyse durchgeführt worden. In den letzten drei Tagen vor der Lebertransplantation bestand bei diesem Patienten kein Fieber. Präoperativ hatte dieser Patient Neomycin und perioperativ Ampicillin, Meropenem und Sulbactam erhalten. *Escherichia coli* war sensibel gegen die gegebenen Medikamente, nicht aber *Candida tropicalis*. Bei dem zweiten Patienten wurde kulturell in der Leber *Klebsiella pneumoniae*

nachgewiesen. Die PCR-Analyse war negativ. In den letzten drei Tagen vor der Lebertransplantation bestand bei diesem Patienten ebenso kein Fieber. Präoperativ hatte der Patient Ampicillin und Cefotaxim und perioperativ Ampicillin und Sulbactam erhalten. *Klebsiella pneumoniae* war nicht sensibel gegen die gegebenen Antibiotika.



**Abbildung 12: Todesursachen nach Lebertransplantationen (in absoluten Häufigkeiten)**

## 5 Diskussion

### 5.1 Interpretation der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnten verschiedene Bakterien und Pilze in Lebergewebe, Galle und Blut von Patienten zum Zeitpunkt ihrer Lebertransplantation nachgewiesen werden.

In Lebergewebe wurden bei 15 % aller Patienten mittels Kulturmedien Keime nachgewiesen, in Galle war dies bei 17 % der Patienten der Fall (Abbildung 13 und 14). Mithilfe der PCR-Analyse wurden bei 33 % der Patienten Bakterien und/oder Pilze nachgewiesen (Abbildung 15).

Insgesamt wurden bei 35 % aller Patienten, also bei gut einem Drittel, Keime in Lebergewebe und/oder Galle mithilfe von Kulturen und/oder PCR-Analyse gefunden (Abbildung 16).

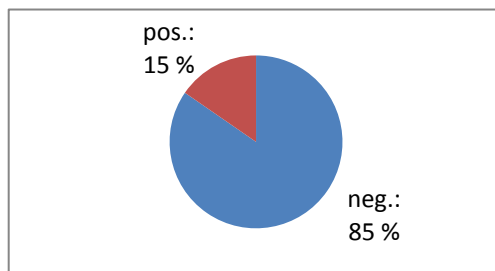


Abbildung 13: Ergebnisse der Kulturen der Leberbiopsien (in Prozent)

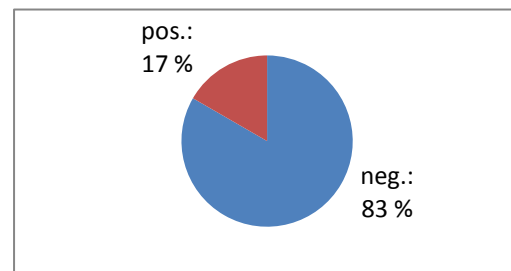


Abbildung 14: Ergebnis der Kulturen der Gallenaspirationen (in Prozent)

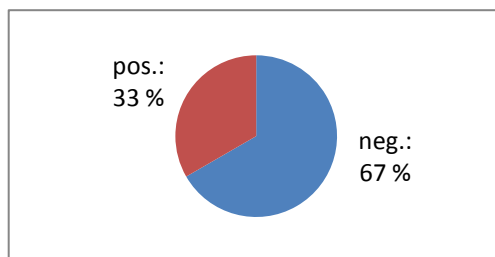


Abbildung 15: Ergebnisse der PCR-Analysen aus Lebergewebe (in Prozent)

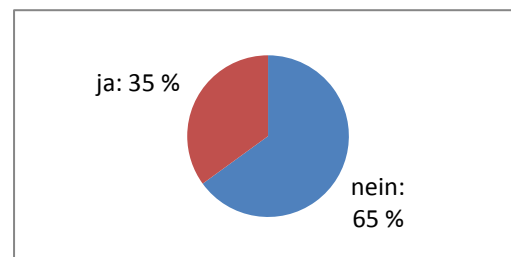


Abbildung 16: Positiver Befund in Lebergewebe und/oder Galle (in Prozent)

Bakterien oder Pilze im Blut wurden bis auf eine Ausnahme nur bei Patienten nachgewiesen, bei denen bereits im Lebergewebe oder der Galle ebenfalls Keime gefunden wurden. Allerdings konnten insgesamt bei nur 4 Patienten Erreger im Blut nachgewiesen werden. Wenn man berücksichtigt, dass Blutkulturen bei Cholangitiden

häufig negativ sind, ist das allerdings nicht verwunderlich (Sahu et al., 2011, Englesbe, Dawes, 2005). Alle Patienten hatten prä- und/oder perioperativ eine Antibiotikaphylaxe erhalten. Es ist davon auszugehen, dass die Prävalenz für Keime in Lebergewebe und Galle anderenfalls höher wäre. Durch die begonnene Therapie ist der Keimnachweis deutlich erschwert worden (Borde et al., 2010, Sakka et al., 2009, Hunfeld et al., 2008).

### **5.1.1 Erregernachweis mithilfe von Kulturen versus PCR-Analysen**

In der Einleitung dieser Arbeit war die Frage gestellt worden, welches Nachweisverfahren am besten dazu geeignet ist in Leber und Galle vorliegende Erreger zu erfassen.

Die PCR-Analyse aus Lebergewebe scheint mit 33 % positiven Ergebnissen die sensitivste Methode zum Nachweis von Keimen zu sein. Diese Aussage ist allerdings aus verschiedenen Gründen mit Vorsicht zu betrachten. Einerseits ist die Stichprobe von 52 Patienten sehr klein und andererseits wurden zwar alle Leberbiopsien kultiviert, aber nicht alle mittels einer PCR-Analyse untersucht (52 versus 24 Proben). Außerdem ist die PCR-Analyse eine hocho sensible Nachweismethode, so dass sie auch Erreger, die nur in sehr kleinen, klinisch eventuell irrelevanten Mengen vorliegen, detektieren kann. Für die Durchführung der PCR-Analyse gibt es verschiedene Argumente. Im Allgemeinen liefert sie schneller Ergebnisse als Kulturen, die für eine zuverlässige Keimidentifizierung in aller Regel 2 bis 3 Tage benötigen (Sakka et al., 2009, Dark et al., 2009). Weiterhin ist keine vorherige Anzucht der Erreger nötig und eine bereits erfolgte Antibiotikatherapie stellt in der Regel kein Problem dar. Dahingegen ist die Sensitivität von Blutkulturen unter antibiotischer Therapie erheblich eingeschränkt (Borde et al., 2010, Sakka et al., 2009, Hunfeld et al., 2008, Dark et al., 2009). Des Weiteren existieren Bakterien, die spezielle Wachstumsbedingungen benötigen, so dass eine kulturelle Anzucht ganz unmöglich sein kann.

Für die Durchführung von Kulturen sprechen andere Argumente. Die Kosten hierbei sind niedriger (Hunfeld et al., 2008, Clarridge, 2004). Außerdem handelt es sich um eine Standardmethode, die in jedem Labor durchgeführt werden kann. Bei der Durchführung von Kulturen werden neben der Detektion der Erreger die Antibiotika- und Antimykotikaresistenzen bestimmt. Das ist vor allem vor dem Hintergrund von

zunehmenden Resistenzen ein wichtiges Argument für die Durchführung von Kulturen (Mancini et al., 2010, Pletz et al., 2011).

### 5.1.2 Infektionserreger versus Kontaminationskeime

Grundsätzlich ist zu sagen, dass sowohl bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials als auch bei der Durchführung der Kulturen und PCR-Analysen alle gängigen Vorsichtsmaßnahmen getroffen wurden, um Kontaminationen zu verhindern. Bei Leber und Galle handelt es sich physiologischerweise um sterile Medien. Daher ist zunächst jeder Keimnachweis als relevant einzustufen (Afdhal et al., 2011, Sung et al., 1992).

Dennoch muss grundsätzlich bei bestimmten Ergebnissen eine Kontamination in Erwägung gezogen werden. Es gibt bestimmte Erreger, die typischerweise Kontaminationen von Untersuchungsmaterialien verursachen können. Dazu gehören in erster Linie Bakterien, die zur physiologischen Hautflora zählen, also die Koagulase-negativen Staphylokokken (wie zum Beispiel *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus haemolyticus*), Corynebakterien, Micrococcaceae, Dermacoccaceae und Propionibakterien (Hall, Lyman, 2006). Je geringer die Konzentration eines nachgewiesenen Keimes ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass es sich dabei um eine Kontamination handelt. Ebenso handelt es sich mit größerer Wahrscheinlichkeit um eine Kontamination, wenn bei einer PCR-Analyse nur einer von zwei Ansätzen positiv getestet wurde.

Die folgende Tabelle (Tabelle 8) gibt einen Überblick über die in Lebergewebe und Galle nachgewiesenen Bakterien und Pilze, um anschließend die einzelnen Befunde diskutieren zu können.

**Tabelle 8: Erreger, die in einem oder mehreren Nachweisverfahren identifiziert wurden**

<b>Erreger</b>	<b>Anzahl infizierter Patienten</b>
Koagulase-negative Staphylokokken	4
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Enterococcus faecium/faecalis</i>	3
<i>Klebsiella</i> spp.	3



Candida spp.	2
Pseudomonas spp.	2
Enterobacter cloacae	1
Hafnia alvei	1
Stenotrophomonas maltophilia	1
Lactobacillus gasseri	1
Aeromonas hydrophila	1
Pichia anomala	1
Ascomycota	1
Phosporaceae	1
Dermacoccaceae	1
Sonstige Erreger (nicht genau bestimmbar)	2
<b>Gesamtzahl</b>	<b>28</b>

Bei allen nachgewiesenen Bakterien und Pilzen handelt es sich um fakultativ pathogene Keime. Keiner davon ist obligat pathogen. Allerdings können alle nachgewiesenen Keime, vor allem bei immunsupprimierten Patienten, relevante Infektionen auslösen. Bei 2 Patienten wurden Koagulase-negativen Staphylokokken kulturell nur vereinzelt nachgewiesen. Hier muss unter Umständen eine Kontamination in Erwägung gezogen werden.

Außerdem sind in einer PCR-Analyse Koagulase-negative Staphylokokken nachgewiesen worden, bei denen nur einer von zwei Ansätzen positiv war und das auch nur mit einem späten Signal, so dass in diesem Einzelfall mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Kontamination ausgegangen werden kann.

In einer weiteren PCR-Analyse sind Dermacoccaceae nachgewiesen worden. Diese Bakterienfamilie gehört zu den Hautkeimen und damit zu den potentiellen

Kontaminationskeimen (Hall, Lyman, 2006).

Bei *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae* und *Hafnia alvei* handelt es sich um Mitglieder der Familie der Enterobakterien. Diese sind gramnegative Stäbchenbakterien und gehören zur normalen Darmflora. *Enterococcus faecium*, -*faecalis* und *Lactobacillus gasseri* gehören ebenfalls zur physiologischen Darmflora des Menschen. Alle in diesem Abschnitt genannten Bakterien können Cholangitiden und Sepsen auslösen (Hahn, 2009).

*Pseudomonas* spp. und *Stenotrophomonas maltophilia* gehören beide zu den nichtfermentierenden Stäbchen und sind ubiquitär vorkommende Bakterien. Als typische Umweltkeime mit hoher Resistenz sind die beiden erwähnten Bakterien häufig an nosokomialen Infektionen beteiligt (Hahn, 2009). Ferner sind positive Gallenbefunde mit nichtfermentierenden Stäbchenbakterien beschrieben worden (Kawecki et al., 2007).

*Aeromonas hydrophila* ist ein gramnegatives Bakterium. Es wurden ebenfalls hepatobiliäre Infektionen und Sepsen beschrieben (Hahn, 2009).

Bei *Candida albicans* und *Candida tropicalis* handelt es sich um Hefepilze. Beide können ernstzunehmende Candidämien auslösen und sind in Galle nachzuweisen (Hahn, 2009, Millonig et al., 2006).

*Pichia anomala* ist ein Hefepilz, der in Käse und Rohmilch vorkommt. Seine klinische Bedeutung ist unklar. Bisher ist unserem Wissen nach kein Nachweis von *Pichia anomala* in Lebergewebe oder Galle beschrieben worden. Allerdings gibt es Literatur zu Fungämien durch *Pichia anomala* (Chakrabarti et al., 2001, Bhardwaj et al., 2007). Ascomycota und Phosporaceae sind ebenfalls Pilze.

## **5.2 Vergleich mit anderen Studienergebnissen**

Wie in der Einleitung bereits ausführlicher erwähnt, wurden in einer von Olsson et al. (1998) durchgeführten Studie Galleaspirate und Gallengangsbiopsien kulturell untersucht, die während Lebertransplantationen gewonnen worden waren. Alle kulturpositiven Patienten waren an primär sklerosierender Cholangitis erkrankt. In dieser Patientengruppe wurden bei 58 % der Patienten Erreger detektiert. Am häufigsten sind alpha-hämolysierende Streptokokken nachgewiesen worden, Bakterien die primär

zur Flora des Oropharynx gehören. In der hier vorliegenden Studie wurden diese Bakterien bei keinem Patienten nachgewiesen. Die Autoren warfen die Frage auf, ob alpha-hämolysierende Streptokokken entweder als Folge von Kontaminationen im Rahmen von vorhergehenden endoskopisch-retrograden Cholangiographien (ERC) oder als an der Ätiologie der primär sklerosierenden Cholangitis beteiligte Bakterien im Gallengangssystem der betroffenen Patienten vorlagen. Letzteres konnte in einer weiteren Studie von Björnsson et al. (2000), die im gleichen Krankenhaus durchgeführt wurde, verneint werden. Dabei wurde Galle von Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis mit und ohne vorheriger ERC miteinander verglichen (Björnsson et al., 2000). Am zweithäufigsten wurden *Staphylococcus* spp. und *Enterococcus* spp. gefunden, die in der hier vorliegenden Studie ebenfalls unter den am häufigsten nachgewiesenen Bakterien sind. Außerdem wurden *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pneumococcus* spp., *Pseudomonas* spp. und Pilze identifiziert. Auffällig ist, dass Olsson et al. (1998) bei keinem der Patienten *Escherichia coli* nachgewiesen haben. Diese nahmen in unserer Studie eine wichtige Rolle ein. Alle weiteren von Olsson et al. identifizierten Erreger konnten auch in unserer Studie nachgewiesen werden, mit Ausnahme von Pneumokokken und den bereits erwähnten alpha-hämolysierenden Streptokokken (Olsson et al., 1998).

Ebenfalls in der Einleitung sind Studien von Millonig et al. (2006) und Kawecki et al. (2007) thematisiert worden, in denen Galleaspirate nach Lebertransplantationen untersucht wurden. Millonig et al. konnten in 73 % aller Galleproben Erreger nachweisen, bei Kawecki et al. war dies in 52 % aller Galleproben der Fall. In beiden Studien wurden gram-positive Kokken am häufigsten nachgewiesen. Bei Millonig et al. war *Enterococcus* sp. am häufigsten nachgewiesen worden und bei Kawecki et al. waren es Koagulase-negative Staphylokokken. Letztere waren auch in unserer Studie die am häufigsten nachgewiesenen Bakterien. Millonig et al. wiesen außerdem in absteigender Häufigkeit folgende Erreger nach: *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Enterobacter* sp., *Streptococcus intermedius*, Koagulase-negative Staphylokokken, *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacteroides* sp. (Millonig et al., 2006). Bei Kawecki et al. nahmen *Enterococcus* spp. den zweiten Platz ein, gefolgt von Enterobakterien und nichtfermentierenden Stäbchen (Kawecki et al., 2007).

Vergleicht man nun die beiden letztgenannten Studien mit der von uns durchgeführten

Studie, so fällt auf, dass in unserer Studie zu einem geringeren Prozentsatz Erreger aus Galle isoliert werden konnten. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass wir bei allen Patienten, bei denen dies möglich war, Galle aspirierten. In den beiden beschriebenen Studien waren hingegen nur Patienten eingeschlossen, bei denen nach Lebertransplantation eine Galleninfektion vermutet wurde oder bei denen aufgrund von vermuteter Cholestase eine ERC durchgeführt werden musste. Wir konnten Bakterien und Pilze in ähnlicher Verteilung wie beschrieben nachweisen. Eine Ausnahme stellt dar, dass wir keine Anaerobier nachweisen konnten. Dabei handelt es sich allerdings um besonders empfindliche Bakterien, so dass möglicherweise ein spezielles Transportmedium notwendig gewesen wäre.

Bei nicht lebertransplantierten Patienten sieht das typische Keimspektrum von Gallenwegserkrankungen interessanterweise etwas anders aus als in unserer und den hier beschriebenen Studien. Gram-negative Bakterien, vor allem *Escherichia coli*, aber auch *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter baumani* complex und *Enterobacter cloacae* spielen bei nicht lebertransplantierten Patienten die größte Rolle (Karpel et al., 2011, Flores et al., 2003, Chang et al., 2002, Sattar et al., 2007, Neve et al., 2003). Koagulase-negative Staphylokokken, Enterokokken und *Candida* spp. haben nur eine untergeordnete Bedeutung. Die Unterschiede zwischen transplantierten und nichttransplantierten Patienten erklären sich möglicherweise durch die ungleiche Immunkompetenz der beiden Gruppen (Kawecki et al., 2007, Kawecki et al., 2009). Die Gabe von Antibiotika vor und während Transplantationen scheint dabei ebenfalls eine Rolle zu spielen (Millonig et al., 2006).

### **5.3 Risikofaktoren für den Nachweis von Bakterien und Pilzen in Lebergewebe und Galle**

In der Einleitung war die Frage aufgeworfen worden, ob es Patientengruppen gibt, bei denen besonders häufig Bakterien und/oder Pilze in Leber und/oder Gallenwegen zu finden sind.

### **5.3.1 Cholestatische versus nicht cholestatische Lebererkrankungen**

Wie bereits im Ergebnisteil gezeigt, wurde bei 17 Patienten (32,7 %) die Indikation zur Lebertransplantation aufgrund einer cholestatischen Lebererkrankung gestellt. Die restlichen 35 Patienten (67,3 %) wurden aufgrund einer nichtcholestatischen Lebererkrankung transplantiert. In der Gruppe „cholestatische Lebererkrankung“ gab es bei 11 Patienten positive Befunde und in der Gruppe „nichtcholestatische Lebererkrankung“ war dies bei 7 Patienten der Fall. Daraus lässt sich berechnen, dass in unserer Studie bei 64,7 % der Patienten mit cholestatischer Lebererkrankung Erreger detektiert werden konnten, aber nur bei 20 % der Patienten mit einer nichtcholestatischen Lebererkrankung. Cholestatische Lebererkrankungen scheinen in einem höheren Maße mit Keimbesiedlung der Leber und Gallenwege einherzugehen als nicht cholestatische. Diese Beobachtung deckt sich gut mit der Tatsache, dass Cholestase eines der wichtigsten Risikofaktoren zur Entstehung von Cholangitiden ist.

### **5.3.2 Fieber**

Bei insgesamt 4 Patienten, aller in die Studie eingeschlossenen Patienten, trat präoperativ Fieber auf. Bei 3 dieser Patienten konnten Bakterien und Pilze nachgewiesen werden. Aufgrund der kleinen Fallzahl kann aber keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob eine Korrelation zwischen präoperativem Auftreten von Fieber und Keimbesiedlung von Leber und Gallenwegen besteht. Dies kann lediglich vermutet werden.

### **5.3.3 Positive Histologie**

Wie im Ergebnisteil bereits gezeigt wurde, gelang bei 6 von 15 Patienten (40 %) mit histologischen Zeichen einer Cholangitis tatsächlich ein Erregernachweis in der Leberbiopsie oder Galle, bei den übrigen 9 Patienten (60 %) war das nicht der Fall. Bei 11 von 36 Patienten (31 %) ohne histologische Zeichen einer Cholangitis war dennoch ein Erregernachweis in der Leberbiopsie oder Galle gelungen, bei den übrigen 25 Patienten (69 %) war das nicht der Fall.

Eine mögliche Erklärung für ein fehlendes histologisches Korrelat bei nachgewiesenen Erregern kann eine bereits erfolgte Antibiotikagabe oder eine geringe Erregermenge sein. Einige Patienten zeigten histologisch Zeichen einer Cholangitis, ohne dass Erreger

nachgewiesen werden konnten. Dies wirft die Frage auf, ob tatsächlich in einem höheren Prozentsatz Erreger vorlagen.

Aus den erhobenen Daten lässt sich ableiten, dass sich nur schwer eine Korrelation zwischen histologischen Zeichen einer Cholangitis und deren kulturellem Nachweis herstellen lässt.

#### **5.4 Kritische Sicht auf die Studie**

Ein zentraler Schwachpunkt der Studie ist sicherlich die relativ kleine Stichprobe von 52 Patienten. Die erhobenen Daten erlauben nur eine deskriptive Statistik und keine darüber hinaus gehenden Schlussfolgerungen. Dennoch handelt es sich bei der hier vorliegenden Studie um die mit der größten Patientenzahl bei Probengewinnung während Lebertransplantation.

Wenn man die Methodik kritisch beleuchtet, fallen wenige weitere Schwachpunkte auf. Einer davon ist die Tatsache, dass nicht alle kultivierten Gewebe bzw. Flüssigkeiten auch einer PCR-Analyse unterzogen wurden. Ausschlaggebend dafür waren finanzielle Gründe, da die Kinderklinik nur die Kosten für die PCR-Analysen ihrer Patienten übernehmen konnte. Erwachsene Patienten wurden daher nicht untersucht. Kritisch anzumerken ist außerdem, dass die ersten sechs Gewebebiopsien zu Beginn der Studie, nach Gewebeentnahme sofort bei -80 °C eingefroren worden waren. Im längsten Fall war das Gewebe knapp drei Monate eingefroren, im kürzesten Fall knapp zwei Monate. Die Proben wurden in gefrorenem Zustand an das Labor zur PCR-Analyse geschickt und dort kontrolliert aufgetaut, um Zellschäden zu verhindern. Dennoch kann es durch Gefrier- und Tautvorgänge zu Zerreißungsvorgängen der DNA kommen (Molzylm). Dadurch ist es möglich, dass zu Beginn der Studie nicht alle tatsächlich in Gewebeproben vorliegenden Erreger detektiert wurden.

#### **5.5 Schlussfolgerungen**

Die native Leber von Patienten unter Lebertransplantation ist in hohem Maße und mit einer Vielzahl verschiedener Bakterien und Pilze besiedelt. Es ist von großer klinischer Relevanz, frühzeitig eine mögliche Besiedlung der explantierten, kranken Leber

diagnostizieren zu können, um so entweder prophylaktisch Antibiotika bzw. Antimykotika geben zu können oder aber bei einer sich entwickelten Sepsis frühzeitig mit einer gezielten Behandlung beginnen zu können. So entwickelte beispielsweise einer der in der Studie eingeschlossenen Säuglinge nach seiner Lebertransplantation eine klinisch relevante Candida-Sepsis, die dank der bereits vorliegenden Ergebnisse der Kultur und PCR-Analyse der Galle sehr effektiv und zeitnah antimykotisch behandelt werden konnte. Kulturen und PCR-Analysen sind wichtige Methoden zur Identifizierung der beteiligten Pilze und Bakterien, da nur durch die Kombination beider Methoden ein breites Keimspektrum zu detektieren und ein Antibiogramm zu erstellen ist.

Alle möglichen Bemühungen sollten unternommen werden um Patienten ein möglichst morbiditätsfreies Überleben zu gewährleisten. Daher wurden einige der hier untersuchten Methoden in die Routinediagnostik nach Lebertransplantation im Kindesalter am Universitätsklinikum Essen aufgenommen. Gerade die PCR-Analyse aus Lebergewebe und Galle erwies sich als hilfreich.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden prospektiven Studie war es, die Prävalenz, das mikrobiologische Spektrum und die Antibiotikaresistenzen von Keimbefestigung in Galle und Lebergewebe bei leberkranken Patienten zum Zeitpunkt ihrer Transplantation zu bestimmen. Hierzu gibt es in der Literatur bisher kaum Daten. Die Studie wurde vor dem Hintergrund durchgeführt, dass Infektionen die Hauptursache für Morbidität und Letalität nach Lebertransplantationen sind. Die meisten lebertransplantierten Patienten leiden unter einer chronischen Lebererkrankung, so dass zumindest teilweise von Keimbefestigungen auszugehen ist. Diese Keime können während der Transplantation in die Blutbahn ausgeschwemmt werden. Durch die an die Transplantation anschließende Immunsuppression können latent im Körper vorliegende Keime reaktiviert werden. Außerdem werden Infektionen unter Immunsuppression häufig erst in fortgeschrittenen Stadien nachgewiesen und erfordern dann umso schnelleres Handeln um Morbidität und Letalität abzuwenden. Insgesamt konnten 52 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Bei allen Patienten konnten während der Transplantation Leberbiopsien entnommen werden und bei 36 Patienten Gallenblasenpunktate. Es wurden kulturelle und molekulargenetische Nachweismethoden eingesetzt. Insgesamt kamen acht verschiedene Nährmedien zum Einsatz. Bei den pädiatrischen Patienten wurde eine Real-Time polymerase chain reaction (PCR) durchgeführt. Es konnten insgesamt bei 35 % aller Patienten in Lebergewebe und/oder Galle Bakterien und/oder Pilze nachgewiesen werden. In Lebergewebe wurden bei 15 % der Patienten kulturell Keime nachgewiesen, in Galle war dies bei 17 % der Patienten der Fall. Mittels der PCR-Analyse wurden bei 33 % der Patienten Bakterien und/oder Pilze nachgewiesen. Bei 4 Patienten konnten Koagulase-negative Staphylokokken nachgewiesen werden, gefolgt von *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium/faecalis* und *Klebsiella species (spp.)* bei jeweils 3 Patienten. Weitere Nachweise waren unter anderem *Candida spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Lactobacillus gasseri* und *Aeromonas hydrophila*. Bei allen nachgewiesenen Bakterien und Pilzen handelte es sich um fakultativ pathogene Keime, die vor allem bei immunsupprimierten Patienten schwere Infektionen auslösen können. Die prä- und perioperativ eingesetzten Antibiotika waren nur zum Teil sensibel gegen die nachgewiesenen Bakterien und Pilze.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Adam, R., McMaster, P., O'Grady, J.G., Castaing, D., Klempnauer, J.L., Jamieson, N., Neuhaus, P., Lerut, J., Salizzoni, M., Pollard, S., Muhlbacher, F., Rogiers, X., Garcia Valdecasas, J.C., Berenguer, J., Jaeck, D., Moreno Gonzalez, E., European Liver Transplant Association. (2003): Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl.* 9, 1231-1243.
2. Afdhal, N.H., Chopra, S., Calderwood, S.B., Travis, N.C.: Acute cholangitis. 2011a, Online-Publikation; <http://www.uptodate.com/contents/acute-cholangitis>.
3. Arnow, P.M. (1991): Infections following orthotopic liver transplantation. *HPB Surg.* 3, 221-32; discussion 232-3.
4. Avery, R.K. (2002): Recipient screening prior to solid-organ transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 35, 1513-1519.
5. Bechstein, W.O., Burra, P., (2005): Transplantation abdomineller Organe - Was gibt es Neues? Bremen u.a.: UNI-MED-Verl.
6. Bhardwaj, S., Sutar, R., Bachhawat, A.K., Singhi, S., Chakrabarti, A. (2007): PCR-based identification and strain typing of *Pichia anomala* using the ribosomal intergenic spacer region IGS1. *J. Med. Microbiol.* 56, 185-189.
7. Björnsson, E.S., Kilander, A.F., Olsson, R.G. (2000): Bile duct bacterial isolates in primary sclerosing cholangitis and certain other forms of cholestasis--a study of bile cultures from ERCP. *Hepatogastroenterology.* 47, 1504-1508.
8. Borde, J.P., Klein, R., Halley, F., Offensperger, W.B. (2010): Blood culture collection. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 135, 355-358.
9. Brett, U., Heintschel von Heinegg, E., (1998): Basiswissen Mikrobiologie : Praktikum der Bakteriologie und Mykologie ; mit Tabellen. Frankfurt am Main: Umschau-Zeitschr.-Verl. Breidenstein.
10. Bundesärztekammer. (2011): Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG. *Dtsch Arztebl.* 108, A662-A673.
11. Chakrabarti, A., Singh, K., Narang, A., Singhi, S., Batra, R., Rao, K.L., Ray, P., Gopalan, S., Das, S., Gupta, V., Gupta, A.K., Bose, S.M., McNeil, M.M. (2001): Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in Northern India. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1702-1706.
12. Chang, W.T., Lee, K.T., Wang, S.R., Chuang, S.C., Kuo, K.K., Chen, J.S., Sheen, P.C. (2002): Bacteriology and antimicrobial susceptibility in biliary tract disease: an audit of 10-year's experience. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 18, 221-228.

13. Cheruvattath, R., Balan, V. (2007): Infections in Patients With End-stage Liver Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 41, 403-411.
14. Clark, N.M., Cottler, S.J., Marr, K.A., Brown, R.S., Thorner, A.R.: Infectious complications in liver transplantation. 2011b, Online-Publikation; <http://www.uptodate.com/contents/infectious-complications-in-liver-transplantation>.
15. Clarridge, J.E. ,3rd. (2004): Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 840-62, table of contents.
16. Cuervas-Mons, V., Julio Martinez, A., Dekker, A., Starzl, T.E., Van Thiel, D.H. (1986): Adult liver transplantation: an analysis of the early causes of death in 40 consecutive cases. *Hepatology.* 6, 495-501.
17. Dark, P.M., Dean, P., Warhurst, G. (2009): Bench-to-bedside review: the promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. *Crit. Care.* 13, 217.
18. del Pozo, J.L. (2008): Update and actual trends on bacterial infections following liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* 14, 4977-4983.
19. Denk, H., (2000): Pathologie der Leber und Gallenwege 37 Tabellen. 2, völlig neu bearb Aufl. Berlin u.a.: Springer.
20. Deutsche Stiftung Organtransplantation, (2012): Organspende und Transplantationen in Deutschland: Jahresbericht 2011.
21. Disqué, C., Kaling, M., Wolkersdorfer, U., Lorenz, M. (2006): Automatisierte Probenvorbereitung für die PCR Diagnostik von Sepsis. *Biospektrum.* 12, 105-106.
22. Englesbe, M.J., Dawes, L.G. (2005): Resistant pathogens in biliary obstruction: importance of cultures to guide antibiotic therapy. *HPB (Oxford).* 7, 144-148.
23. Eurotransplant. (2012): Eurotransplant Statistics 2011.
24. Fernandez, J., Navasa, M., Gomez, J., Colmenero, J., Vila, J., Arroyo, V., Rodes, J. (2002): Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology.* 35, 140-148.
25. Fishman, J.A. (2007): Infection in solid-organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 357, 2601-2614.
26. Fishman, J.A., AST Infectious Diseases Community of Practice. (2009): Introduction: infection in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 9 Suppl 4, S3-6.

27. Fishman, J.A., Marr, K.A., Thorner, A.R.: Evaluation for infection before solid organ transplantation. 2012a,  
Online-Publikation; <http://www.uptodate.com/contents/evaluation-for-infection-before-solid-organ-transplantation>.
28. Fishman, J.A., Marr, K.A., Thorner, A.R.: Infection in the solid organ transplant recipient. 2012b,  
Online-Publikation; <http://www.uptodate.com/contents/infection-in-the-solid-organ-transplant-recipient>.
29. Flores, C., Maguilnik, I., Hadlich, E., Goldani, L.Z. (2003): Microbiology of choledochal bile in patients with choledocholithiasis admitted to a tertiary hospital. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 333-336.
30. Fonseca-Aten, M., Michaels, M.G. (2006): Infections in pediatric solid organ transplant recipients. *Semin. Pediatr. Surg.* 15, 153-161.
31. Ganschow, R. (2011): Pädiatrische Lebertransplantation 2011. *Tx Med.* 23, 4-9.
32. Gebert, S., Siegel, D., Wellinghausen, N. (2008): Rapid detection of pathogens in blood culture bottles by real-time PCR in conjunction with the pre-analytic tool MolYsis. *J. Infect.* 57, 307-316.
33. Hahn, H. (2009): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6, komplett überarb Aufl. Heidelberg: Springer.
34. Hall, K.K., Lyman, J.A. (2006): Updated review of blood culture contamination. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 788-802.
35. Handschur, M., Karlic, H., Hertel, C., Pfeilstocker, M., Haslberger, A.G. (2009): Preanalytic removal of human DNA eliminates false signals in general 16S rDNA PCR monitoring of bacterial pathogens in blood. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 207-219.
36. Herold, G., (2011): Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold.
37. Hunfeld, K.P., Bingold, T., Brade, V., Wissing, H. (2008): Molecular biological detection of pathogens in patients with sepsis. Potentials, limitations and perspectives]. *Anaesthesist.* 57, 326-337.
38. Karpel, E., Madej, A., Buldak, L., Dulawa-Buldak, A., Nowakowska-Dulawa, E., Labuzek, K., Haberka, M., Stojko, R., Okopien, B. (2011): Bile bacterial flora and its in vitro resistance pattern in patients with acute cholangitis resulting from choledocholithiasis. *Scand. J. Gastroenterol.* 46, 925-930.

39. Kawecki, D., Chmura, A., Pacholczyk, M., Lagiewska, B., Adadynski, L., Wasiak, D., Czerwinski, J., Malkowski, P., Sawicka-Grzelak, A., Kot, K., Wroblewska, M., Rowinski, W., Durlík, M., Paczek, L., Luczak, M. (2009): Bacterial infections in the early period after liver transplantation: etiological agents and their susceptibility. *Med. Sci. Monit.* 15, CR628-37.
40. Kawecki, D., Chmura, A., Pacholczyk, M., Lagiewska, B., Adadynski, L., Wasiak, D., Malkowski, P., Sawicka-Grzelak, A., Rokosz, A., Szymanowska, A., Swoboda-Kopec, E., Wroblewska, M., Rowinski, W., Durlík, M., Paczek, L., Luczak, M. (2007): Bacteria isolated from bile samples of liver recipients in the early period after transplantation: epidemiology and susceptibility of the bacterial strains. *Transplant. Proc.* 39, 2807-2811.
41. Keller, P., Hombach, M., Bloemberg, G. (2010): 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. *BIOspektrum.* 19, 755-758.
42. Kuhn, C., Disqué, C., Muhl, H., Orszag, P., Stiesch, M., Haverich, A. (2011): Evaluation of commercial universal rRNA gene PCR plus sequencing tests for identification of bacteria and fungi associated with infectious endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2919-2923.
43. Kusne, S., Dummer, J.S., Singh, N., Iwatsuki, S., Makowka, L., Esquivel, C., Tzakis, A.G., Starzl, T.E., Ho, M. (1988): Infections after liver transplantation. An analysis of 101 consecutive cases. *Medicine (Baltimore).* 67, 132-143.
44. Laish, I., Braun, M., Mor, E., Sulkes, J., Harif, Y., Ben Ari, Z. (2011): Metabolic syndrome in liver transplant recipients: prevalence, risk factors, and association with cardiovascular events. *Liver Transpl.* 17, 15-22.
45. Langner, C., Denk, H. (2001): Chronic cholangitis. *Pathologe.* 22, 375-387.
46. Mancini, N., Carletti, S., Ghidoli, N., Cichero, P., Burioni, R., Clementi, M. (2010): The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 235-251.
47. Martin, S.R., Alvarez, F., Anand, R., Song, C., Yin, W., SPLIT Research Group. (2011): Outcomes in children who underwent transplantation for autoimmune hepatitis. *Liver Transpl.* 17, 393-401.
48. Millonig, G., Buratti, T., Graziadei, I.W., Schwaighofer, H., Orth, D., Margreiter, R., Vogel, W. (2006): Bactobilia after liver transplantation: frequency and antibiotic susceptibility. *Liver Transpl.* 12, 747-753.
49. Miloh, T., Anand, R., Yin, W., Vos, M., Kerkar, N., Alonso, E., Studies of Pediatric Liver Transplantation Research Group. (2011): Pediatric liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Liver Transpl.* 17, 925-933.
50. Molzym, UMD Universal Handbuch. Molzym.

51. Moon, J.I., Barbeito, R., Faradji, R.N., Gaynor, J.J., Tzakis, A.G. (2006): Negative impact of new-onset diabetes mellitus on patient and graft survival after liver transplantation: Long-term follow up. *Transplantation*. 82, 1625-1628.
52. National Institutes of Health. (1984): Consensus Development Conference Statement: liver transplantation--June 20-23, 1983. *Hepatology*. 4, 107S-110S.
53. Neve, R., Biswas, S., Dhir, V., Mohandas, K.M., Kelkar, R., Shukla, P., Jagannath, P. (2003): Bile cultures and sensitivity patterns in malignant obstructive jaundice. *Indian J. Gastroenterol.* 22, 16-18.
54. Ng, V.L., Fecteau, A., Shepherd, R., Magee, J., Bucuvalas, J., Alonso, E., McDiarmid, S., Cohen, G., Anand, R., Studies of Pediatric Liver Transplantation Research Group. (2008): Outcomes of 5-year survivors of pediatric liver transplantation: report on 461 children from a north american multicenter registry. *Pediatrics*. 122, e1128-35.
55. Ojo, A.O., Held, P.J., Port, F.K., Wolfe, R.A., Leichtman, A.B., Young, E.W., Arndorfer, J., Christensen, L., Merion, R.M. (2003): Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N. Engl. J. Med.* 349, 931-940.
56. Olsson, R., Björnsson, E.S., Backman, L., Friman, S., Hockerstedt, K., Kaijser, B., Olausson, M. (1998): Bile duct bacterial isolates in primary sclerosing cholangitis: a study of explanted livers. *J. Hepatol.* 28, 426-432.
57. Pletz, M.W., Wellinghausen, N., Welte, T. (2011): Will polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostics improve outcome in septic patients? A clinical view. *Intensive Care Med.* 37, 1069-1076.
58. Rayes, N., Bechstein, W.O., Keck, H., Blumhardt, G., Lohmann, R., Neuhaus, P. (1995): Cause of death after liver transplantation: an analysis of 41 cases in 382 patients. *Zentralbl. Chir.* 120, 435-438.
59. Richards, J., Gunson, B., Johnson, J., Neuberger, J. (2005): Weight gain and obesity after liver transplantation. *Transpl. Int.* 18, 461-466.
60. Rudolph, G., Gotthardt, D., Kloters-Plachky, P., Kulaksiz, H., Rost, D., Stiehl, A. (2009): Influence of dominant bile duct stenoses and biliary infections on outcome in primary sclerosing cholangitis. *J. Hepatol.* 51, 149-155.
61. Sahu, M.K., Chacko, A., Dutta, A.K., Prakash, J.A. (2011): Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in acute bacterial cholangitis. *Indian J. Gastroenterol.* 30, 204-208.
62. Saito, T., Senda, K., Takakura, S., Fujihara, N., Kudo, T., Inuma, Y., Kiuchi, T., Tanimoto, M., Ichiyama, S. (2003): Biliary bacteria in living related liver transplant recipients: microbiology and rapid detection system using flow cytometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 159-163.

63. Sakka, S.G., Kochem, A.J., Disqué, C., Wellinghausen, N. (2009): Blood infection diagnosis by 16S rDNA broad-spectrum polymerase chain reaction: the relationship between antibiotic treatment and bacterial DNA load. *Anesth. Analg.* 109, 1707-1708.
64. Sattar, I., Aziz, A., Rasul, S., Mehmood, Z., Khan, A. (2007): Frequency of infection in cholelithiasis. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 17, 48-50.
65. Schaefer, S., (2006): Diagnostik von Infektionen der Leber. München u.a.: Elsevier, Urban & Fischer.
66. Schirmacher, P., Fleig, W.E., Dienes, H.P., Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP), Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Kompetenznetz Hepatitis (HepNet). (2004): Biopsy diagnosis of chronic hepatitis. *Z. Gastroenterol.* 42, 175-185.
67. Schmidt, J., Muller, S.A., Mehrabi, A., Schemmer, P., Buchler, M.W. (2008): Orthotopic liver transplantation. Techniques and results. *Chirurg.* 79, 112-120.
68. Sheiner, P.A., Magliocca, J.F., Bodian, C.A., Kim-Schluger, L., Altaca, G., Guarrera, J.V., Emre, S., Fishbein, T.M., Guy, S.R., Schwartz, M.E., Miller, C.M. (2000): Long-term medical complications in patients surviving > or = 5 years after liver transplant. *Transplantation.* 69, 781-789.
69. Singh, N. (2003): Fungal infections in the recipients of solid organ transplantation. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 17, 113-34.
70. Starzl, T.E., Klintmalm, G.B., Iwatsuki, S., Fernandez-Bueno, C. (1981a): Past and future prospects of orthotopic liver transplantation. *Arch. Surg.* 116, 1342-1343.
71. Starzl, T.E., Klintmalm, G.B., Porter, K.A., Iwatsuki, S., Schroter, G.P. (1981b): Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N. Engl. J. Med.* 305, 266-269.
72. Starzl, T.E., Marchioro, T.L., Vonkaulla, K.N., Hermann, G., Brittain, R.S., Waddell, W.R. (1963): Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surg. Gynecol. Obstet.* 117, 659-676.
73. Sung, J.Y., Costerton, J.W., Shaffer, E.A. (1992): Defense system in the biliary tract against bacterial infection. *Dig. Dis. Sci.* 37, 689-696.
74. Tanaka, A., Prindiville, T.P., Gish, R., Solnick, J.V., Coppel, R.L., Keeffe, E.B., Ansari, A., Gershwin, M.E. (1999): Are infectious agents involved in primary biliary cirrhosis? A PCR approach. *J. Hepatol.* 31, 664-671.
75. Thalheimer, U., Triantos, C.K., Samonakis, D.N., Patch, D., Burroughs, A.K. (2005): Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut.* 54, 556-563.

76. Torbenson, M., Wang, J., Nichols, L., Jain, A., Fung, J., Nalesnik, M.A. (1998): Causes of death in autopsied liver transplantation patients. *Mod. Pathol.* 11, 37-46.
77. Watt, K.D., Pedersen, R.A., Kremers, W.K., Heimbach, J.K., Sanchez, W., Gores, G.J. (2009): Long-term probability of and mortality from de novo malignancy after liver transplantation. *Gastroenterology*. 137, 2010-2017.
78. Wellinghausen, N., Kochem, A.J., Disqué, C., Muhl, H., Gebert, S., Winter, J., Matten, J., Sakka, S.G. (2009): Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2759-2765.

## 8 Anhang

### 8.1 Antibiotikaresistenzen

R: resistent, S: sensibel, I: intermediär

#### **Aeromonas hydrophila**

<b>Patient 1 / Lebergewebe</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	I
Piperacillin	S
Piperacillin/Tazobac	S
Cefazolin	R
Cefuroxim	R
Cefotaxim	S
Ceftazidim	S
Cefepim	S
Ertapenem	R
Imipenem	I
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Amikacin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
Colistin (lokal)	S



**Enterobacter cloacae**

<b>Patient 27 / Galle</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	R
Piperacillin	I
Piperacillin/Tazobac	I
Cefazolin	R
Cefuroxim	R
Cefotaxim	I
Ceftazidim	R
Cefepim	S
Ertapenem	S
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Amikacin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
Colistin (lokal)	R

**Enterococcus faecium**

<b>Patient 4 / Blutkultur</b>	
Penicillin G	R
Oxacillin	R
Ampicillin	R

Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	R
Cefazolin	R
Ceftriaxon	R
Imipenem	R
Synercid	S
Gentamicin	R
Trimethoprim/Sulfam	R
Tetracyclin	R
Ciprofloxacin	R
Levofloxacin	R
Clindamycin	R
Erythromycin	R
Linezolid	S
Teicoplanin	I
Vancomycin	S
Amoxicillin/Clavulan	R
Azithromycin	R

<b>Patient 45 / Blutkultur</b>	
Penicillin G	R
Oxacillin	R
Ampicillin	R
Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	R
Cefazolin	R
Ceftriaxon	R
Imipenem	R

Gentamicin	R
Trimethoprim/Sulfam	R
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	R
Levofloxacin	R
Clindamycin	R
Erythromycin	R
Linezolid	S
Teicoplanin	S
Vancomycin	S
Quinupristin-Dalfopr	S
Amoxicillin/Clavulan	R
Azithromycin	R

Zusätzlich sind Enterokokken gegen Cephalosporine resistent.

### **Escherichia coli**

<b>Patient 2 / Lebergewebe</b>	
Ampicillin	S
Ampicillin/Sulbactam	S
Piperacillin	S
Piperacillin/Tazobac	S
Cefuroxim - Sodium	S
Cefuroxim - Axetil	S
Cefpodoxim	S
Cefotaxim	S
Ceftazidim	S
Imipenem	S
Meropenem	S

Gentamicin	S
Tobramycin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
ESBL	-

<b>Patient 8 / Lebergewebe</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	R
Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	R
Cefuroxim - Sodium	S
Cefuroxim - Axetil	S
Cefpodoxim	S
Cefotaxim	S
Ceftazidim	S
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Trimethoprim/Sulfam	R
Tetracyclin	R
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
ESBL	-

<b>Patient 8 / Galle</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	R
Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	R
Cefuroxim - Sodium	S
Cefuroxim - Axetil	S
Cefpodoxim	S
Cefotaxim	S
Ceftazidim	S
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Trimethoprim/Sulfam	R
Tetracyclin	R
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
ESBL	-

<b>Patient 14 / Galle</b>	
Ampicillin	S
Ampicillin/Sulbactam	S
Piperacillin	S
Piperacillin/Tazobac	S
Cefuroxim	S
Cefuroxim - Axetil	I
Cefpodoxim	S

Cefotaxim	S
Ceftazidim	S
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
ESBL	-

#### **Hafnia alvei**

<b>Patient 1 / Lebergewebe</b>	
Ampicillin	I
Ampicillin/Sulbactam	I
Piperacillin	S
Piperacillin/Tazobac	S
Cefazolin	R
Cefuroxim	S
Cefotaxim	S
Ceftazidim	S
Cefepim	S
Ertapenem	S
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S

Amikacin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
Colistin (lokal)	R

<b>Patient 1 / Blutkultur</b>	
Ampicillin	S
Ampicillin/Sulbactam	S
Piperacillin	S
Piperacillin/Tazobac	S
Cefazolin	I
Cefuroxim	S
Cefotaxim	S
Ceftazidim	S
Cefepim	S
Ertapenem	S
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Amikacin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
Colistin (lokal)	R

**Klebsiella pneumoniae**

<b>Patient 2 / Lebergewebe</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	R
Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	I
Cefuroxim - Sodium	S
Cefuroxim - Axetil	S
Cefpodoxim	S
Cefotaxim	S
Ceftazidim	S
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	R
Tobramycin	R
Trimethoprim/Sulfam	R
Tetracyclin	R
Ciprofloxacin	R
Levofloxacin	R
ESBL	-

<b>Patient 43 / Galle</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	S
Piperacillin	I
Piperacillin/Tazobac	S
Cefazolin	I
Cefuroxim	I
Cefotaxim	S



Ceftazidim	S
Cefepim	S
Ertapenem	S
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Amikacin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	R
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
Colistin (lokal)	S

<b>Patient 51 / Lebergewebe</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	R
Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	R
Cefuroxim	R
Cefuroxim – Axetil	R
Cefpodoxim	R
Cefotaxim	R
Ceftazidim	R
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	R
Tobramycin	R

Trimethoprim/Sulfam	R
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	R
Levofloxacin	R
Nitrofurantoin	R
ESBL	+

### **Pseudomonas aeruginosa**

<b>Patient 27 / Galle</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	R
Piperacillin	S
Piperacillin/Tazobac	S
Cefazolin	R
Cefuroxim	R
Cefotaxim	R
Ceftazidim	S
Cefepim	S
Ertapenem	R
Imipenem	S
Meropenem	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Amikacin	S
Trimethoprim/Sulfam	R
Tetracyclin	R
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S

Colistin (lokal)	S
------------------	---

### **Staphylococcus epidermidis**

<b>Patient 3 / Galle</b>	
Penicillin G	R
Oxacillin	R
Ampicillin	R
Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	R
Cefazolin	R
Cefuroxim	R
Ceftriaxon	R
Cefepim	R
Ertapenem	R
Imipenem	R
Meropenem	R
Synercid	S
Daptomycin	S
Gentamicin	R
Tobramycin	R
Trimethoprim/Sulfam	R
Tetracyclin	R
Ciprofloxacin	R
Levofloxacin	R
Clindamycin	R
Erythromycin	R
Linezolid	S
Teicoplanin	S

Vancomycin	S
Rifampicin	S
Fusidinsäure (lokal)	I
Fosfomycin	S
Mupirocin	S
Amoxicillin/Clavulan	R
Azithromycin	R

<b>Patient 39 / Lebergewebe</b>	
Penicillin G	S
Oxacillin	S
Imipenem	S
Gentamicin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	R
Ciprofloxacin	S
Moxifloxacin	S
Clindamycin	S
Erythromycin	R
Linezolid	S
Teicoplanin	S
Vancomycin	S

Zusätzlich ist *Staphylococcus epidermidis* in diesem Fall gegen Ampicillin und Sulbactam sensibel.

### ***Staphylococcus haemolyticus***

<b>PATIENT 7 / Lebergewebe</b>	
Penicillin G	S

Oxacillin	S
Imipenem	S
Gentamicin	S
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	S
Moxifloxacin	S
Clindamycin	R
Erythromycin	R
Linezolid	S
Teicoplanin	S
Vancomycin	S

#### **Stenotrophomonas maltophilia**

<b>Patient 43 / Lebergewebe</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	R
Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	R
Cefazolin	R
Cefuroxim	R
Cefotaxim	R
Ceftazidim	R
Cefepim	R
Ertapenem	R
Imipenem	R
Meropenem	R
Gentamicin	R

Tobramycin	R
Amikacin	R
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	I
Ciprofloxacin	R
Levofloxacin	S
Colistin (lokal)	R

Zusätzlich ist *Stenotrophomonas maltophilia* gegen Erythromycin resistent.

<b>Patient 43 / Galle</b>	
Ampicillin	R
Ampicillin/Sulbactam	R
Piperacillin	R
Piperacillin/Tazobac	R
Cefazolin	R
Cefuroxim	R
Cefotaxim	R
Ceftazidim	R
Cefepim	R
Ertapenem	R
Imipenem	R
Meropenem	R
Gentamicin	R
Tobramycin	R
Amikacin	R
Trimethoprim/Sulfam	S
Tetracyclin	S
Ciprofloxacin	R
Levofloxacin	I

Colistin (lokal)	R
------------------	---

Zusätzlich ist *Stenotrophomonas maltophilia* gegen Erythromycin resistent.

## 8.2 Antimykotikaresistenzen

### **Candida albicans**

<b>Patient 3 / Galle</b>	
Amphotericin B	S
5-Flucytosin	S
Voriconazol	S
Fluconazol	S
Caspofungin	S

### **Candida tropicalis**

<b>Patient 8 / Galle</b>	
Amphotericin B	S
5-Flucytosin	I
Voriconazol	S
Fluconazol	S
Caspofungin	S

### **8.3 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Patrick Gerner, für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung. Ebenso möchte ich ihm für die konstruktive Kritik und Ermutigung danken, wann immer ich mit meiner Arbeit unzufrieden war.

Frau Dr. med. Heintschel von Heinegg und Herr Dr. med. Steinmann aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie am Universitätsklinikum Essen standen mir stets als kompetente Gesprächspartner mit Rat zu Seite. Vielen herzlichen Dank dafür.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Volker Bickert für das aufmerksame Korrekturlesen und bei meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung bedanken.



## **8.4 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.